



TITLE:

神経突起のパターン制御と平面内  
細胞極性の形成における7回膜貫通  
型カドヘリンの機能解析(  
Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

碓井, 理夫

---

CITATION:

碓井, 理夫. 神経突起のパターン制御と平面内細胞極性の形成における  
7回膜貫通型カドヘリンの機能解析. 京都大学, 2000, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2000-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3167154>

RIGHT:

学位申請論文

神経突起のパターン制御と平面内細胞極性の形成における7回膜貫通型カドヘリンの機能解析

京都大学大学院理学研究科  
生物科学専攻 生物物理学系

碓井理夫

目次

主論文

要旨	4
第1章. 序論	9
第2章. <i>flamingo</i> ( <i>fmi</i> ) の同定	
2-0. はじめに	17
2-1. 結果	
2-1-1. <i>flamingo</i> の全 ORF を含む cDNA のクローニング	19
2-1-2. 予想される Flamingo タンパクの一次構造	20
2-1-3. 胚および3 齢幼虫での <i>fmi</i> 発現様式	27
2-1-4. Fmi の翻訳後切断と複合体形成	27
2-1-5. 胚期における Fmi タンパクの分布	29
2-1-6. Fmi による細胞集合塊の形成	31
2-2. 考察	
2-2-1. カドヘリンスーパーファミリーの多様性	34
2-2-2. Flamingo ファミリー分子の機能	34
第3章. 神経突起のパターン形成の制御についての解析	
3-0. はじめに	37
3-1. 結果	
3-1-1. <i>fmi</i> 変異体の分離	38
3-1-2. 胚中枢神経系での軸索走行異常の解析	41
3-1-3. 胚末梢神経系での神経突起パターン異常の解析	43
3-1-4. R-axon の投射における Fmi の役割	50
3-2. 考察	
3-2-1. Fmi を介した軸索ガイダンス	57

3-2-2. Fmi と樹状突起形成	58
3-2-3. 神経細胞の極性と軸索ガイダンス	59

第4章. 平面内細胞極性の形成における役割の追究

4-0. はじめに	63
4-1. 結果	
4-1-1. <i>fmi</i> 平面内細胞極性を制御している	65
4-1-2. Fmi は翅表皮細胞の P/D 境界面に分布している	65
4-1-3. Fmi は細胞境界面の両側に分布している	67
4-1-4. Fmi の細胞内分布の制御メカニズム	69
4-1-5. Fz 活性の差が Fmi の分布パターンを決める (1)	69
4-1-6. Fz 活性の差が Fmi の分布パターンを決める (2)	71
4-1-7. <i>fmi</i> の勾配発現による翅毛極性の変化は <i>fz</i> の場合の逆である	72
4-1-8. <i>fmi</i> の優性表現型の多様性	75
4-2. 考察	
4-2-1. Fmi の細胞内分布は細胞極性を予示している	77
4-2-2. Fz が Fmi の偏った分布を制御する	77
4-2-3. Fmi と Fz とのアンタゴニスティックな相互作用 ～モデルの提唱～	78

第5章. 総合議論

5-1. Fmi による神経突起のパターン形成制御	83
5-2. Fmi による平面内細胞極性の形成	84
5-3. 今後の展望	85

第6章. 材料と方法

6-1. 分子生物学的操作	89
6-2. タンパクの取り扱い	91
6-3. 組織学的操作	94
6-4. 材料	95
6-5. 別表	102

補遺	104
参考文献	106
謝辞	116

主論文の基礎となる論文

参考論文 1

参考論文 2



## 要旨

機能的な神経回路網の形成は、個々の神経細胞が軸索と樹状突起とを正しい経路で伸長させ、適切なパートナーに投射することによって達成される。この高度に複雑な形態形成運動は、神経突起の先端にある成長円錐と呼ばれる構造体の走行制御機構により統括されている。成長円錐は、その細胞膜上にある種々の細胞間認識分子を使って、絶えず周囲からのシグナルを受け取り、その情報を集積して自らの運動性を制御している。成長円錐が持つ細胞間認識分子のうち未同定の分子の候補として、我々が同定した新規のカドヘリンスーパーファミリー分子の一つ ショウジョウバエ Flamingo (Fmi) に注目した。Fmi はノンクラシックタイプのカドヘリンであり、7 回膜貫通構造をとっている点で他のメンバーとは著しく異なっている。in vitro のアッセイから、細胞外領域にあるカドヘリンに特有な繰返し構造を介して、ホモフィリックな分子間相互作用をしていることがわかっている。また直接の証拠はないが、7 回膜貫通領域を持つことから三量体 G タンパクと共役して細胞内のシグナル伝達にも関与することが期待された。

*fmi* の突然変異体を分離したところ、胚や成虫の神経系において軸索伸長や樹状突起のパターン異常がみとめられた。これは、神経突起の形成過程において Fmi が成長円錐の進行方向や運動性を制御していることを示唆している。軸索走行パターン形成の新たな機構の解明につながるだけでなく、解析の遅れていた樹状突起のパターン形成機構の理解にも貢献すると期待できる。一方、*fmi* は神経系で広く発現する他に、上皮系の組織でも発現している。変異体の表現型解析から、じつは Fmi は上皮細胞の平面内極性の形成にも関与することを明らかにした。興味深いことに、Fmi タンパク自身が一時的に上皮細胞膜上の特定の部位に偏って存在していることがわかってきた。そして、この細胞内分布が Frizzled という別の 7 回膜貫通タンパクの活性によって制御されていることも明らかにした。

このように Fmi は複数の発生現象において多面的な役割を果たしている。その分子機能を追究すれば、神経突起のパターン形成機構と平面内細胞極性の制御機構の間の共通点と相違点とを浮き彫りにできるだろう。その結果として、両者の分子機構に対する理解がより深まっていくと期待できる。

## 第 1 章

第 1 章. 序論

1-1. 神経突起のパターン形成

神経突起のパターン形成と成長円錐

ヒトの脳にはおよそ $10^{12}$ 個のニューロンが存在しており、それらが $10^{15}$ 個のシナプスを形成していると見積られている。しかも、個々のニューロンは決まった位置を占め、驚異的な正確さで適切なパートナーと連絡し合っている。そうして初めて機能的な神経回路としての意味を持つわけである (Fig.1-1)。

神経系の発生過程では、前駆細胞から生まれたニューロンは、まず軸索 (axon) を伸ばし始める。軸索は決まった走路沿いに伸長を続け、ついには特定の標的細胞に近づき、シナプス結合を形成する。一方でニューロンは、一般的には複数の樹状突起

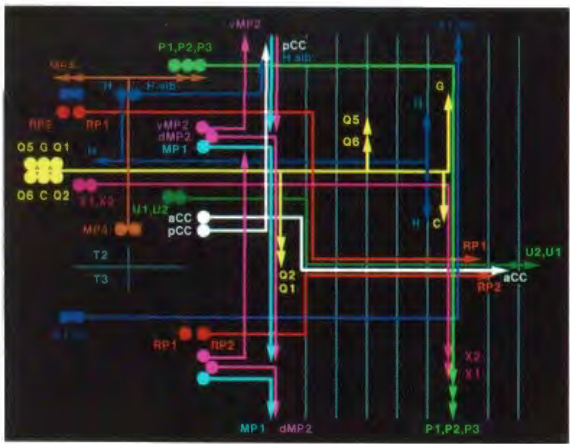


Fig.1-1 バッタの胸部神経節にみられる典型的な軸索の“配線図”  
発生中のバッタ胚の胸部神経節では、個々のニューロンに由来する軸索が、特異的な経路を通して伸長する。例えば、Q1 ニューロンと G ニューロンは同一の前駆細胞から誕生するが、Q1 由来の軸索が dMP2 由来の軸索と束形成して後方に伸長していくのに対し、G 由来の軸索は P1 由来の軸索と束形成して前方に投射していく。

(dendrite) と呼ばれる突起を伸長させ、別のニューロンの軸索の投射をうける。このように複雑な細胞の形態形成運動は、それぞれの突起の先端部にある成長円錐 (growth cone) と呼ばれる構造体の挙動によって決定されている。したがって、神経突起のパターン形成の機構とは、成長円錐と周囲の細胞との間における相互作用と、成長円錐自身の運動性の調節とに還元できるだろう (Goodman and Shatz, 1993; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996)。

成長円錐の挙動の制御機構

成長円錐は的確な走路選択をするために、常に周囲の環境からの情報を収集・分析している。この“アンテナ”としての役割については、近年精力的な研究がなされ多くの知見が得られている (Fig.1-2)。環境から与えられるシグナルは、その性状により 4 つのカテゴリーに分類されている。つまり、近距離作動性の誘因／反発因子と、遠距離作動性の誘因／反発因子である。近距離作動性の因子は、細胞膜や細胞外基質上に拘束されたタンパクであると考えられる。一方、遠距離作動性因子の実体は、拡散性のタンパクと考えられる。たとえば、分泌タンパク Netrin/UNC-6 はいくつかの動物で同定されており (Ishii et al., 1992; Mitchell et al., 1996)、DCC/UNC-40/Frazzled を受容体として、成長円錐にたいして誘因的に作用することが明らかになっている (Keino-Masu et al., 1996; Kolodziej et al., 1996)。

次に成長円錐は、細胞骨格系の再編成を通して実際に“エンジン”として移動していくことになる。移動中の成長円錐の観察から、糸状仮足 (filopodia) および葉状仮足 (lamellipodia) とよばれる突起の伸長が、特定の方向でのみ持続的に起こることが成長円錐を駆動していることがわかっている (O'Connor and Bentley, 1993; Tanaka and Sabry, 1995)。成長円錐内では、細胞骨格系の再編成が部域特異的に行なわれており、これが方向性を持った運動の源泉であると想像されている。先にも述べたように、ここでも重要なのは複数の情報を統合して、最終的な移動方向や速度を算出する必要があるということである。

このメカニズムの詳細はよくわかっていないが、2 つの拡散性因子とそれぞれの受容体についての巧妙な解析から情報集積のメカニズムが明らかにされつつある (Bashaw and Goodman, 1999)。誘因性のシグナルを伝達する受容体の細胞質領域と、反発性のシグナルの伝達に預かる受容体の細胞質領域とを「入れ換え」てやると、それぞれが本来とは逆の活性を示すようになる、というものである。つまり、成長円錐の細胞膜直下において、誘因か反発かの最終的な解釈と判断が下されているわけである。また、視神経軸索の標的認識過程の解析からは、複数の細胞質因子が情報のネットワークをつくっていることが明らかにされつつある (Garrity et al., 1999; Hing et al., 1999; Ruan et al., 1999)。とはいえ、成長円錐の複雑な振る舞いを説明するには、未同定のガイダンス因子についての機能解析が、欠かせない作業であると考えられよう。そこで、



われわれはガイダンス機構に関する因子の候補として、カドヘリンスーパーファミリーに注目した。

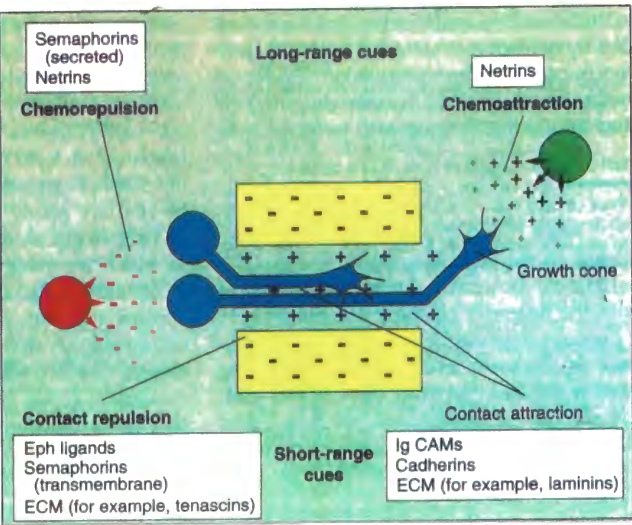


Fig.1-2 軸索ガイダンスを制御する4つの分子機構  
軸索を誘導するシグナルは、接触性の誘引・反発と拡散性因子による誘引・反発とに分類できる。ただし、一つの分子が4つのカテゴリーのどれに属すかは、場合によって変わりうる。つまり例えば、ある軸索に対しては誘引的に働く因子が、別の軸索に対しては反発性に働くことがある。

1-2. カドヘリンスーパーファミリー

カドヘリンスーパーファミリーに属するすべての分子は、その細胞外領域にカドヘリンリピートと呼ばれるドメインがタンデムに繰り返し連続した構造を持っている。このカドヘリンリピートは約110アミノ酸からなり、特有のアミノ酸配列のモチーフが保存されていて、ホモフィリックな分子間相互作用のための機能単位であると考えられている。カドヘリンスーパーファミリーは、構造上の特徴から2つのサブファミリーに分類されてきた。クラシックタイプとノンクラシックタイプである (Fig.1-3; Takeichi, 1995; Uemura, 1998)。クラシックタイプに属する分子は単に「カドヘリン」とも呼ばれ、その定義は細胞内領域のカルボキシ末端にカテニン結合ドメインを持つことである。このドメインを介してカドヘリン-カテニン複合体を形成し、細胞骨格系と相互作用することが強固な接着活性を発揮するのに必要である (Nagafuchi and Takeichi, 1988; Hirano et al., 1992; Tepass and Hartenstein, 1994)。ノンクラシックタイプに属する分子は、カテニン結合ドメインを持たず、強固な接着活性を示さない (Sano et al., 1993)。

クラシックタイプのカドヘリン分子群は、様々な解析から軸索ガイダンスに必須な

因子の一つであると考えられている。例えば、ショウジョウバエの神経系で発現している *DN*-カドヘリンは軸索束の形成や特定の成長円錐の進行方向の決定に重要な役割を果たしている (Iwai et al., 1997)。また、アフリカツメガエルの網膜神経細胞の軸索の伸長には *N*-カドヘリンが正常に機能することが必要であるらしいことがわかっている (Riehl et al., 1996)。

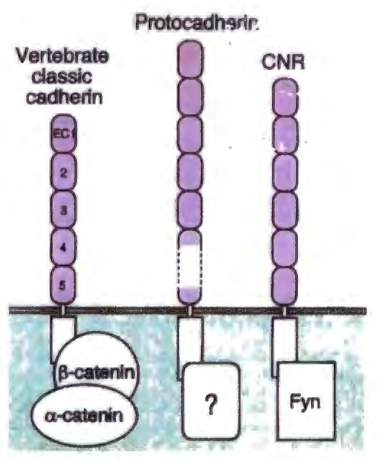


Fig.1-3 カドヘリンスーパーファミリーに属す分子群  
カドヘリンスーパーファミリーに属す3つのサブファミリーの分子の構造を示す。細胞外領域の繰り返し構造の数はサブファミリー間で異なっている。クラシックタイプの分子は細胞内領域でカテニンと相互作用する。一方、CNR は非レセプター型キナーゼ Fyn と細胞内領域を介して結合している。

一方、ノンクラシックタイプの分子の役割は未知の部分が多い。例えば、Fat は細胞外領域に 34 個ものカドヘリンリピートを持つ分子で、ショウジョウバエからヒトまで保存されている。遺伝学的な解析から細胞の増殖をコントロールする癌抑制遺伝子であるが、その作用機構の分子的な実態はまったく不明である。また、大きな遺伝子クラスターをつくっていることで知られる CNR は非レセプター型キナーゼである Fyn と結合することしかわかっていなかった。しかし最近になって、脳の層構造の形成に関わる分泌因子 Reelin の機能的な受容体であるとの報告がなされた (Senzaki et al., 1999)。カドヘリンリピート構造を分子間の相互作用モジュールとして捉えるならば (Fig.1-4; Shapiro et al., 1995)、ノンクラシックタイプの分子群が軸索ガイダンスに関与するレセプター分子として働きうると考えることは、無理のない予想であるといえるだろう。

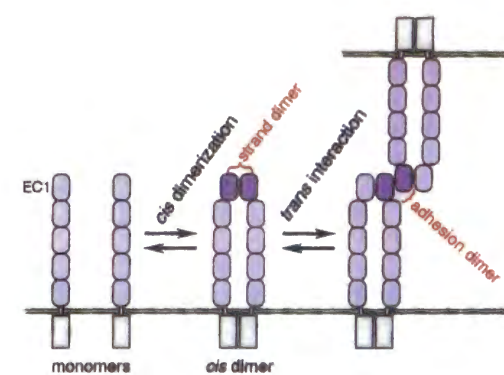


Fig.1-4 相互作用モジュールとしてのカドヘリンリピート構造  
クラシックタイプに属するカドヘリンの細胞外領域の繰り返し構造についての結晶解析から、この繰り返し構造がシスもしくはトランスの分子間相互作用の機能単位として結合しうることが示唆されている。

### 1-3. モデル動物としてのショウジョウバエ

軸索ガイダンス機構の解析という課題に取り組むとき、個体・細胞・分子にわたる様々なレベルで総合的に検証していくうえで、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は、モデル動物として以下のような利点を持っている。

- (1) 遺伝学的な解析技術を駆使できる。
- (2) すでに、神経系の形態異常をしめす変異株が多数分離されている。
- (3) 同定可能で比較的少数の細胞群のみを取り扱うことができる (Landgraf et al., 1996)。
- (4) 特定の組織や細胞を識別しうる分子マーカーが豊富に存在する (Patel, 1994)。

このような利点から、遺伝学的なアプローチが進められてきた。ひとつの柱は、ある表現型をもつ変異株からスタートして、その原因遺伝子を単離する、古典的な遺伝学的解析法 (forward genetics) である (Van Vactor et al., 1993; Salzberg et al., 1994; Martin et al., 1995)。変異原を用いてゲノム上にランダムに変異を導入し、ある表現型をしめす変異株をすべて分離する試み (saturation mutagenesis) がおこなわれた。その結果、神経ネットワークの形成に必須な遺伝子がいくつか単離されている (Seeger et al., 1993; Van Vactor et al., 1993; Kolodziej et al., 1995)。もうひとつの柱は、神経系で発現する分子を起点にして、その変異体を分離し、分子の機能を追究するアプローチ (reverse genetics) である。大規模なエンハンサートラップ株のスクリーニングや、神経系特異的に反応するモノクローナル抗体のスクリーニングから候補分子が単離され、それらが実際に

必須の機能を持っていることが証明されてきた (Bier et al., 1989; Nose et al., 1992; Lin et al., 1994; Chiba and Keshishian, 1996; Desai et al., 1996; Krueger et al., 1996)。

### 1-4. 平面内細胞極性の形成と軸索ガイダンス

解析を始めた当初は予想していなかったことだが、われわれが同定し解析した分子 Flamingo (Fmi) は、上皮細胞の平面内極性の形成にとっても重要であることがわかってきた。そこで、次のような3つの立場から、軸索ガイダンスと同時に解析を進めていくことにした。

一つの立場は、現象としての類似性に注目したいというものである。軸索ガイダンスが、成長円錐内部の細胞骨格系の動態制御に還元できることは既に述べた。一方、上皮細胞の極性形成も、細胞内の特定の領域における細胞骨格系の再編成過程にほかならない。つまり、Fmi という分子がもつ活性を、単に異なる細胞種が示めす表現型として観察している可能性がある。一つの現象の観察からだけでは得られないような情報が与えられるかもしれない。したがって、2つの現象を共に検討していくことが、分子機能のより深遠な解釈を可能にすると期待できる。

2つ目の立場は、Fmi が神経細胞の極性形成にかかわる可能性が懸念されたことへの対処である。神経細胞の極性については、神経母細胞の頂部-基部極性の制御機構が知られている。しかし、それ以外の極性については未開拓の領域である。Fmi が軸索ガイダンスとは独立の活性として、神経細胞の極性形成に関与すると仮定しよう。この場合、2つの現象を区別しながら吟味しなければならない。そのためには、いずれの現象をも同時に観察できる姿勢が要請される。逆に、まさに神経細胞の極性異常が原因となり、軸索走行が乱れてしまうということも考えられる。その場合には、上皮細胞での極性形成の機構を十分に理解しておくことが重要であろう。神経系の組織は神経細胞が三次元的に集合しており、二次元の上皮組織よりも解析の困難さが予想される。

今一つの立場とは、細胞の極性形成という現象そのものが興味深い現象である、というものだ。これまであまり注目されてこなかったことだが、そもそも軸索が伸長を



開始する方向はどのように規定されているのだろうか。また、細胞体自身の極性と軸索伸長方向には相関関係があるのか。いまだに不明なそうした問題を解く何らかの鍵を与えてくれるかもしれない、という期待がもてる。

1-5. 本研究の流れ

軸索ガイダンスや樹状突起のパターン形成にかかわる分子の機能解析を目指して、カドヘリンスーパーファミリー分子の一つ Flamingo (Fmi) に注目した。本研究では、まず全長の構造を決定し、7回膜貫通領域をもつ巨大なタンパクであることを見いだした。さらに、in vitro での接着活性や細胞内シグナル伝達能の検討を行った。こうした分子の性状の解析を、胚発生における発現パターンの解析と合わせて第2章でまとめる。次に、*fmi* 機能喪失変異体を分離したのち神経系での表現型の解析を行った。その結果、*fmi* が胚の神経系において軸索の正常な伸長や束形成に必要であり、また樹状突起のパターン形成にも必須の役割を果たしていることがわかった。さらに、成虫の光受容細胞の軸索の投射パターンに注目することで、軸索一本一本の解像度で異常を検討することができた。神経系での機能解析を第3章で述べる。*fmi* は神経系だけではなく上皮組織でも広く発現している。これは Fmi が上皮組織での何らかの細胞間相互作用に関することを示唆していた。実際、Fmi は上皮細胞の平面内極性の形成に必須の因子であり、かつそれ自身が発生の特定の時期に細胞内で偏った分布をすることがわかった。この一連の検証を第4章で議論する。最後に第5章の総合議論において、本研究で明らかになった Fmi の役割について、細胞の形態制御と細胞間のコミュニケーションという観点から考察する。

第2章

第 2 章. *flamingo* (*fmi*) の同定

2-0. はじめに

カドヘリンスーパーファミリーのすべての分子は、その細胞外領域に約110アミノ酸のカドヘリンリピートと呼ばれるドメインを持つ (Fig. 1-3)。このカドヘリンリピートには特有のアミノ酸配列のモチーフが保存されている。このスーパーファミリーは、クラシックタイプとノンクラシックタイプとに、二分できる。クラシックタイプの特徴は、細胞内領域のカルボキシ末端にカテニン結合ドメインを持つことである。カドヘリン-カテニン複合体がさらに細胞骨格系と相互作用することが、接着活性に必要である (Nagafuchi and Takeichi, 1988; Hirano et al., 1992)。ノンクラシックタイプの分子は、カテニン結合ドメインを持たず、強固な接着活性を示さない (Sano et al., 1993)。

ショウジョウバエをモデル動物とした研究により、現在までに、おもに上皮で発現する 3 つの分子 *DE* カドヘリン、*Fat* および *Dachsous* が報告されている (Oda et al., 1994; Uemura et al., 1996; Mahony et al., 1991; Clark et al., 1995)。また、おもに神経系で発現する分子 *DN* カドヘリンが単離されており、軸索ガイダンスを制御していることが明らかにされ、また成虫の視覚系でのシナプス形成にも重要な役割を担っていると考えられている (Uchida et al., 1996; Iwai et al., 1997; Iwai et al., 未発表データ)。この4つのうち *DE* カドヘリンと *DN* カドヘリンはクラシックタイプに属す分子であり、*Fat* と *Dachsous* はノンクラシックタイプの分子である。

平野と上村は、ショウジョウバエのカドヘリンスーパーファミリーの分子を、カドヘリンリピートの保存配列に注目して、PCR法によりクローニングすることを試みた。その結果、*fat*、*dachsous*、*DN-cadherin* に加えて、3つの新規遺伝子の cDNA を単離することに成功した (Hirano, 1992)。ノザンブロットング解析から、それぞれの mRNA は、*cad89D* が約 8kb であることを除けば、すべて 15-20kb だった (Fig. 2-1)。

平野により単離されていた 3 つの新規遺伝子の cDNA クローンは、部分配列しか決定されていなかった。従って、それぞれの遺伝子産物が、クラシックタイプかノンクラシックタイプかは不明だった。そのいずれのタイプであっても、主に神経系で発現

する分子であれば、神経系の発生過程における細胞間のコミュニケーションに関与することが期待された。例えば、軸索ガイダンスや樹状突起のパターン形成などの形態形成において、重要な機能を担っている可能性がある。そこで本研究では、まずこれから新規遺伝子の詳細な発現パターンを明らかにしたうえで、次に特に神経系で強く発現する遺伝子の機能解析に集中する、というアプローチをとることにした。

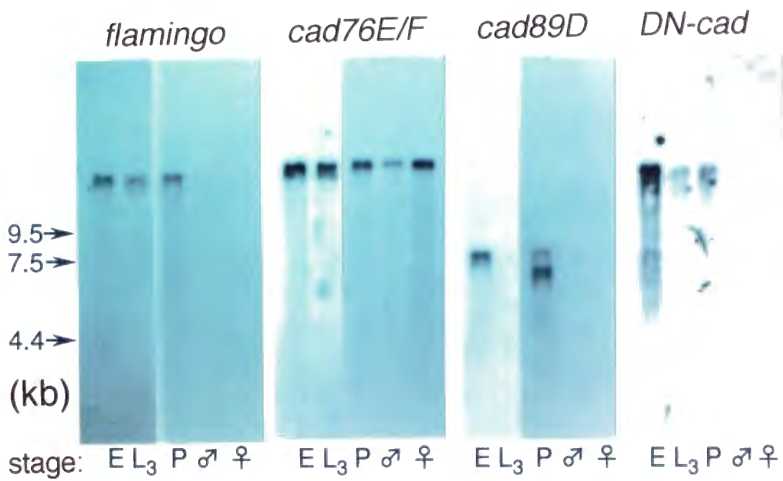


Fig. 2-1 新規カドヘリンスーパーファミリー分子の発現解析 (1)  
4つのカドヘリンスーパーファミリー分子について、胚、三齢幼虫、蛹、成虫 (雄、雌) での mRNA の発現量を検討した。*cad89D* が 6 kb 前後であることを除けば、いずれの mRNA も 15 kb 前後の長大なものであることがわかる。



2-1. 結果

2-1-1. *flamingo* の全 ORF を含む cDNA のクローニング

平野らは、ショウジョウバエの新規カドヘリンスーパーファミリー遺伝子 *cad47B*、*cad76F* および *cad89D* を同定し、それぞれの部分 cDNA を単離していた。本研究では、これらのうち、おもに神経系で発現する遺伝子の機能解析を目指した。発現パターンを調べた結果、*cad47B* が神経系でダイナミックに発現していることがわかり (Fig. 2-2, 2-7)、以後の解析を進めた。*cad76E/F* は上皮全体で発現する一方、中枢神経系のニューロンのサブセットでも発現が見られた。*cad89D* は、各体節前側の表皮にシグナルがみられた (Fig. 2-2)。

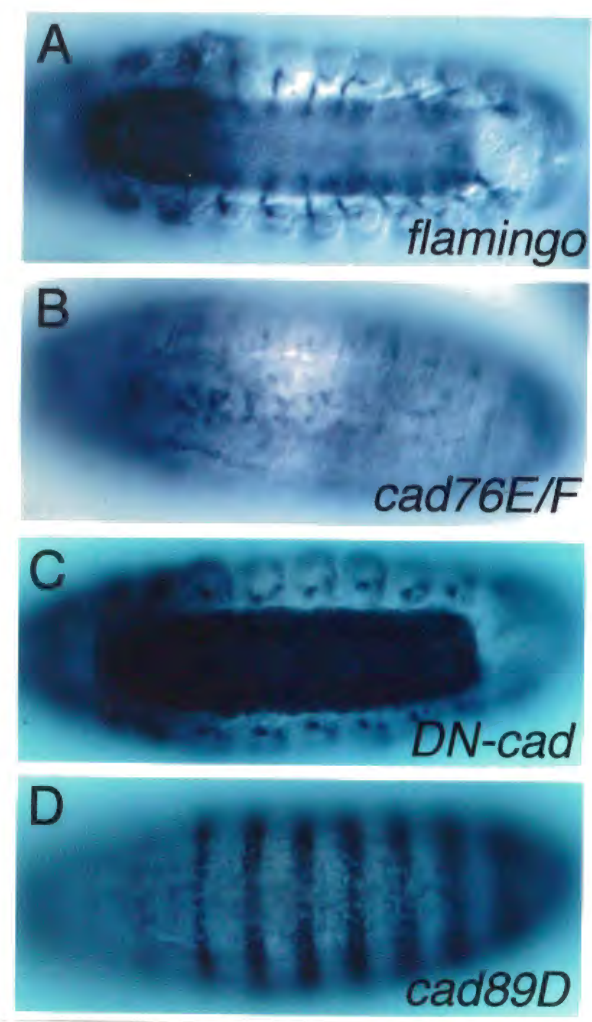


Fig. 2-2 新規カドヘリンスーパーファミリー分子の発現解析 (2)  
4つのカドヘリンスーパーファミリー分子について、後期胚での発現パターンを in situ ハイブリダイゼーション法により解析した。(A) *cad47B/flamingo (fmi)* の発現パターン。中枢神経系で広く発現するほか、末梢のグリア細胞でも発現しているのがわかる。表皮にも弱いシグナルが認められる。(B) *cad76F* の発現パターン。表皮のほか、中枢神経系の少数の細胞で特異的に発現している。(C) *DN-cadherin* の発現パターン。中枢神経系の多くの細胞でシグナルが観察される。末梢神経細胞の一部にも強い発現があるのがわかる。(D) *cad89D* の発現パターン。各体節の前側の表皮細胞に特異的に発現している。

平野が単離した *cad47B* の全長 cDNA を得るため、cDNA クローン No.19 をプローブにして、cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。胚 (AEL 9 - 12 hr) 由来の

cDNA ライブラリーからは、陽性のクローンを得ることは出来なかった。次に、成虫頭部由来の cDNA ライブラリーを用い  $1 \times 10^6$  クローンをスクリーニングして、陽性クローン  $\lambda$ AH7 を単離した。 $\lambda$ AH7 よりも 3' 側の cDNA をコードしている  $\lambda$ AH10-4 および  $\lambda$ AH17-2 は、以下の要領で単離した。 $\lambda$ AH7 の最も 3' 側の配列をもとにプライマーを作製しゲノム DNA クローン  $\lambda$ g1 のインサート DNA の部分塩基配列を決定したところ、未同定のコーディング領域と思われる配列を見いだした。この未同定領域のみを含むゲノム DNA を切り出してプローブとし再度 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、 $\lambda$ AH10-4 および  $\lambda$ AH17-2 を含むクローンを単離できた。単離したクローンと cDNA との関係は図に示した (Fig. 2-3)。

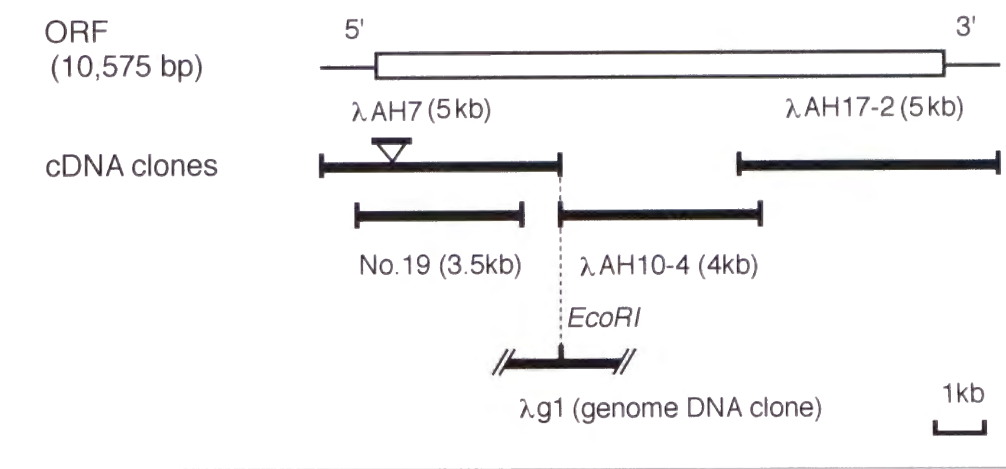


Fig. 2-3 *fmi* の cDNA クローン  
*Fmi* の全長に対して、得られた cDNA クローンを対応させて棒線で示した。クローン No.19 は平野らが単離していた cDNA 断片である。クローン  $\lambda$ AH10-4、 $\lambda$ AH17-2 はゲノムクローン  $\lambda$ g1 をプローブにしたスクリーニングで得られたものである。

2-1-2. 予想される Flamingo タンパクの一次構造

*cad47B* 遺伝子がコードするタンパクの 1 次構造を明らかにするため、得られた cDNA クローン  $\lambda$ AH7、 $\lambda$ AH10-4 および  $\lambda$ AH17-2 の全塩基配列を決定した。その結果、予想される最も長いオープンリーディングフレームは 10,725 塩基対からなり、3,575 アミノ酸のタンパクをコードしていた (Fig. 2-4)。アミノ末端にシグナル配列があり (10 - 34 a.a.)、膜貫通型もしくは分泌型タンパクであると予想された。217 から 1,256 番目にはカドヘリンスーパーファミリーの分子に特有な繰り返し構造 (カドヘリンリピート) が 9 個みられる (Fig. 2-5)。カドヘリンリピートのカルボキシ末端側に、



3つのシステインリッチ領域がある。アミノ末端側の2つの領域(C-1; 1,464 - 1,556 a.a., C-2; 1,676 - 1,793 a.a.)は、Notch や Fat に含まれる EGF 様リピート構造と相同な配列を含み (Mahoney et al., 1991; Dune et al., 1995) Laminin A の globular ドメイン (LmA-G) と相同性が高い (Sasaki et al., 1988)。カルボキシ末端側のシステインリッチ領域 (C-3; 1,962 - 2,150 a.a.) は、Netrin (Harris et al., 1996) や Laminin B2 (Montell et al., 1989) の V-3 ドメインと相同な構造を含んでいる。2,815 から 3,054 番目には、7回膜貫通領域が存在する。セクレチンレセプターファミリーに属する分子 (Ishihara et al., 1991; Ishihara et al., 1992) の7回膜貫通領域と30%程度の相同性 (identity) を持つことから、7回膜貫通領域を形成していると判断した (Hirokawa et al., 1998)。7回膜貫通領域からカルボキシ末端にかけての細胞内領域には、既知のタンパクと高い相同性を持った部分はないが、プロリンとセリンの含有率が高い。また、グルタミンが8個連続した領域をもつほか、SH3 結合モチーフのコンセンサス配列である PxxP という配列が存在する。長大な細胞外領域、7回膜貫通領域、細胞内領域を、それぞれフラミンゴの長い首、胴体、一本足に見立てて、Flamingo (Fmi) と呼ぶことにした。

一方、Adler らのグループはわれわれとは独立に、突然変異体 *starry night* (*stan*) の原因遺伝子のクローニングを行った (Chae et al., 1999)。その結果、*stan* は *fmi* の突然変異であることが判明した。彼らが同定した cDNA から予想される Stan タンパクは 3,579 アミノ酸残基からなり、Fmi タンパクのカルボキシ末端の6アミノ酸残基が11アミノ酸残基からなる別のペプチドに置き換わっていた。両 cDNA とデータベース上のゲノム塩基配列 (BDGP, Celera genomics) とを比較したところ、1つのエキソンを選択的にスキップすることにより、2つのスプライシングバリエーションが存在しており、それぞれが Fmi と Stan に対応していることが示唆された。。Stan タンパクのカルボキシ末端は -ETTV となっており、いわゆる PDZ 結合モチーフの保存配列になっていた (Songyang et al., 1997; 第4章で詳述)。

別の複数のグループが同定しているヒト、マウス、ラットの分子ファミリー human KIAA0279 (Nagase et al., 1996) や rat MEGF2 (Nakayama et al., 1998) や mouse Celsr1, mouse Celsr3 (Hajantnakis et al., 1998) およびわれわれのグループが単離した mouse Fmi1 などは、細胞質領域を除けば、全長にわたり Fmi と高い相同性を示すことから (Fig. 2-5)、脊椎動物のホモログであると考えられる (Lennon et al., 1996)。これらのホ

モログは、組織別のノザン解析や in situ の発現解析から中枢神経系での発現が高いこともわかっている (Hajantnakis et al., 1998; Shima et al., 未発表データ)。また、線虫 *C.elegans* のゲノム配列からもホモログの存在が示唆されている (CeCelsr; データは示していない)。このことから、Fmi は種を越えて保存された分子ファミリーを形成し、進化上保存された機能を持つ分子であることが予想された。



121	
241	1
361	361
481	81
601	601
721	121
161	161
841	841
901	201
1081	241
1201	401
1321	1561
1441	481
1681	1801
1801	561
1921	6161
2401	641
2521	761
2641	801
2881	881
3001	921
3121	3121
3241	1001
3361	1081
3481	1161
3601	1201
3721	1281
3841	1321
3961	1441
4081	1481
4201	1521
4321	1561
4441	1601
4561	1681
4681	1721
4801	1761
4921	1801
5041	1841
5161	1881
5281	1921
5401	1961
5521	2001
5641	2041
5761	2081
5881	2121
6001	2161
6121	2201
6241	2241
6361	2281
6481	2321
6601	2361
6721	2401
6841	2441
6961	2481
7081	2521
7201	2561
7321	2601
7441	2641
7561	2681
7681	2721
7801	2761
7921	2801
8041	2841
8161	2881
8281	2921
8401	2961
8521	3001
8641	3041
8761	3081
8881	3121
9001	3161
9121	3201
9241	3241
9361	3281
9481	3321
9601	3361
9721	3401
9841	3441
9961	3481
10081	3521
10201	3561
10321	3601
10441	3641
10561	3681
10681	3721
10801	3761
10921	3801
11041	3841
11161	3881
11281	3921
11401	3961
11521	4001
11641	4041
11761	4081
11881	4121
12001	4161
12121	4201
12241	4241
12361	4281
12481	4321
12601	4361
12721	4401
12841	4441
12961	4481
13081	4521
13201	4561
13321	4601
13441	4641
13561	4681
13681	4721
13801	4761
13921	4801
14041	4841
14161	4881
14281	4921
14401	4961
14521	5001
14641	5041
14761	5081
14881	5121
15001	5161
15121	5201
15241	5241
15361	5281
15481	5321
15601	5361
15721	5401
15841	5441
15961	5481
16081	5521
16201	5561
16321	5601
16441	5641
16561	5681
16681	5721
16801	5761
16921	5801
17041	5841
17161	5881
17281	5921
17401	5961
17521	6001
17641	6041
17761	6081
17881	6121
18001	6161
18121	6201
18241	6241
18361	6281
18481	6321
18601	6361
18721	6401
18841	6441
18961	6481
19081	6521
19201	6561
19321	6601
19441	6641
19561	6681
19681	6721
19801	6761
19921	6801
20041	6841
20161	6881
20281	6921
20401	6961
20521	7001
20641	7041
20761	7081
20881	7121
21001	7161
21121	7201
21241	7241
21361	7281
21481	7321
21601	7361
21721	7401
21841	7441
21961	7481
22081	7521
22201	7561
22321	7601
22441	7641

601  
161  
281  
681  
401  
721  
761  
801  
841  
881  
001  
121  
241  
361  
481  
081  
601  
721  
1161  
201  
9961  
081  
281  
201  
3321  
361  
41  
401  
561  
441  
481  
521  
921  
561  
601  
1161  
6641  
281  
681  
721  
521  
8641  
8841  
8881  
0001  
2921  
1212  
9961  
9241  
3041  
9481  
9081  
99601  
3721  
33161



9722 TCTACAACCGGAAGGAGCAGAGGTGGCGAGGAGAAACCATCGAGGGGCCAGAGGAAGGACTCAGACTCTGGCTCCGAAACGGATGGAAGATCCCTCGAACTTGCCAGCAGTCACTCCAGC 9841  
3161 S T T G R S R G G E E K P S R R Q R K D S D S G S E T D G R S L E L A S S H S S 3201  
9842 GACGATGATGAGTCCGGACAGCTAGATCTTCTGGTACCCATCGCAGCACCGCGGTGAGTTTCAGCGCAGCCTATTTCGCCAACATCACGGAGCACGTCAGGCCACCCACCGCGCGAA 9961  
3201 D D D E S R T A R S S G T H R S T A V S S T P A Y L P N I T E H V Q A T T P P E 3241  
9962 CTGAATGGTGCAGAGTCGGCAGCTCTTCCCGAGTGTGAATAAGCCCGTCTATGCTCGCGCTGGTCCAGTCAGCTGCCAGATGCGTATTTGCAATCACCTCCGAATATCGGACGGTGG 10081  
3241 L N V V Q S P Q L F P S V N K P V Y A P R W S S Q L P D A Y L Q S P P N I G R W 3281  
10082 TCCCAGGATACTGGATCTGATAACGAACACGCTCCACGGGAAGCGAAGATGACCATCTCGCCGAATCCCTCGCCAAATCCCGATCTCACGGACACCGATTACCTGCAGCAGCACCCACAAC 10201  
3281 S Q D T G S D N E H V H G Q A K M T I S P N P L P N P D L T D T S Y L Q Q H H N 3321  
10202 AAAATCAATATGCCTCCCTCGATCTTGGAAAAATATCCGAGATGCTCGGAGGGCTATGAGGACAGCTTGTATGGGAGAGCTGGAGAGTATCCTGACAAGTATGGCTCTACAAGCCACCC 10321  
3321 K I N M P P S I L E N I R D A R E G Y E D S L Y G R R G E Y P D K Y G S Y K P P 3361  
10322 AGTCACTATGGCAGCAAAAGGACTATCCCGGCGAGGAAGTGGCTCCAGAGCATTTGGTCATATGAGGAGTTTCACCCGAGTGGCGGTACTTGAGTGACAACATATACGACAAGCAG 10441  
3361 S H Y G S E K D Y P G G G S G S Q T I G H M R S F H P D A A Y L S D N I Y D K Q 3401  
10442 CGAACGCTGGGCAGTGGCTACTTGGGCGCAAGTCGGAGTGGCTTACCTGTCCAAGATCGCATAAACCCGATATCTATGGATCCAGGGATGGTCATTATAGCCTCAAGAGACAGCCT 10561  
3401 R T L G S G Y L G A K S E S P Y L S K D R I T P D I Y G S R D G H Y S L K R Q P 3441  
10562 GCCTATGCCAACTGATTCCTTGCATCTCGGTTCAGTCTCTAAAGAACGATTACCACCGAGCAACAGCAGCAGCAACACCAATTGCAAGACAGATTGTCCGAGGGATCGGATAAG 10681  
3441 A Y A T D S L H S V H S L L K N D Y H Q Q Q Q Q Q Q H H L Q D R L S E G S D K 3481  
10682 AATGGCTACCACTTTCCCTACACCGCGAAGAGGATCACCTGCCCGCAGGAAGCTGAGCCACACCCACCGCTTCGCTTCACGGATCCAGCTGATGCAGCCACCTGGAGTGGGCGT 10801  
3481 N G Y H P Y T P Y T A E E D H L P A R K L S H T Q P P S L H G S Q L M Q P P G V G L 3521  
10802 GTCAACGATGTGAACAATCCGGCTTGTATGGGAAGGCACACCTAAATGGAGGATCCGACACAGTTCAGAGCGCTCTCGCCGCCCTCCACCATGGTGGCTCCCATGCAGCCACTGGGC 10921  
3521 V N D V N N P G L M G R H T L N G G S R H S S R A S S P P S T M V A P M Q P L G 3561  
10922 CCACTGACAAGCATCACGATACCGACTCAGAGCGGAATATTGTATGAGGAGCACAGTGTGACGACTGTCCCAGCAGCAACAGCAACAGCAGCAGCAACAATTGAAGCTGCAACA 11041  
3561 P L T S I T D T D S E A E Y \* 3576  
11042 AAGCAGCAGCAGCGCGCAGCAACACATGCAACAATTGCAGCAGCAACGCACCAAGCAACAGAGCAGAAGCAAGCGCAATATTTGCCACCATTAGACGCAAGCGCAGTACAGGATTCA 11161  
11162 CACGAGGACTGAGTCCCTTCTTGCCAATCGATACGATCGTAGCATACTTTGGGAGCACTGCCATAGGGGCATGCCGCTTATATAATTGAAACTTTGTACATACAAGCACCCACTTAAT 11281  
11282 TTTACGTAACCCAGCTTAGTATACCCCATTCGGGCACAGATATTTATACGATAGCTAGCATTTACATAAATTGAGCGCGCAGTTGCATTTCGTTCCGAATTGCATAACTCGCATGCA 11401  
11402 CACACAGACAGAACTACTCAGCTTTAGCCTTGTGTATGTATTATAAAATACACTATATAATTATGTATTAAAAAAGAGTCAGACTGATTTTATGCATTTTACGTTCTGCTATTATAT 11521  
11522 ATAAGCCCCACACAACATTTAGCCAGCGAGCTCATGCATTTAGGTCCAATTACCATACCATTTACCAATTACCAATTTTGAATGCCCCAGATCCGATTCCGGTTCCGAACGAGGGCGGATA 11641  
11642 TCGGTTCTCAGTCGCACTTTAGTTTGAGAACGTTTGTGTGCTCGAGCTTTTATGCCAAATTAGTTGAAGTCGAAGGGGAACCTTGAAATGAAAAATAATCTCGGAAAGTTTGCAATT 11761  
11762 CATTTCGCTAGCATCCGCACATGTTGCCATTTAGTTTGGGAGTTAGTTTAAATGATAGCATCTACTATCCGTACGAACGTTGCGAATGTACAATAAGCCCCCTGCAAGAGAAAACAA 11881  
11882 GTAAATAAAATCAGGACAGTTCCCGTATTATGCGAAATATAGAAATCCACATGCGCAGCATTGACATATCTCGCAAAGTATACTCGATACATATATCTGTCTATAATATCCGAGTCTCTGG 12001  
12002 CAAAAGGAAGCTCGACCAACAGTTTGATCCCGACTCAGCAATAGCCGCTCATGCCCCTCAGAACTATGTACAAATTTATAAAATAATTCATAAGCCGTACTTACTGTACTCGAACTCCACT 12121  
12122 CACTGCCACTCATTTGTGGCACCTACGTAAGCTATGGATCGCGCTTGAAATGTGGCTCACAATATCTGATATTTATGTGA 12200

Fig. 2-4 *flamingo* の ORF の塩基配列と予想されるアミノ酸配列

*flamingo* 遺伝子の ORF の塩基配列と予想される翻訳産物のアミノ酸配列を示した。Flamingo は 3,573 アミノ酸からなる巨大な膜貫通タンパクであると考えられる。

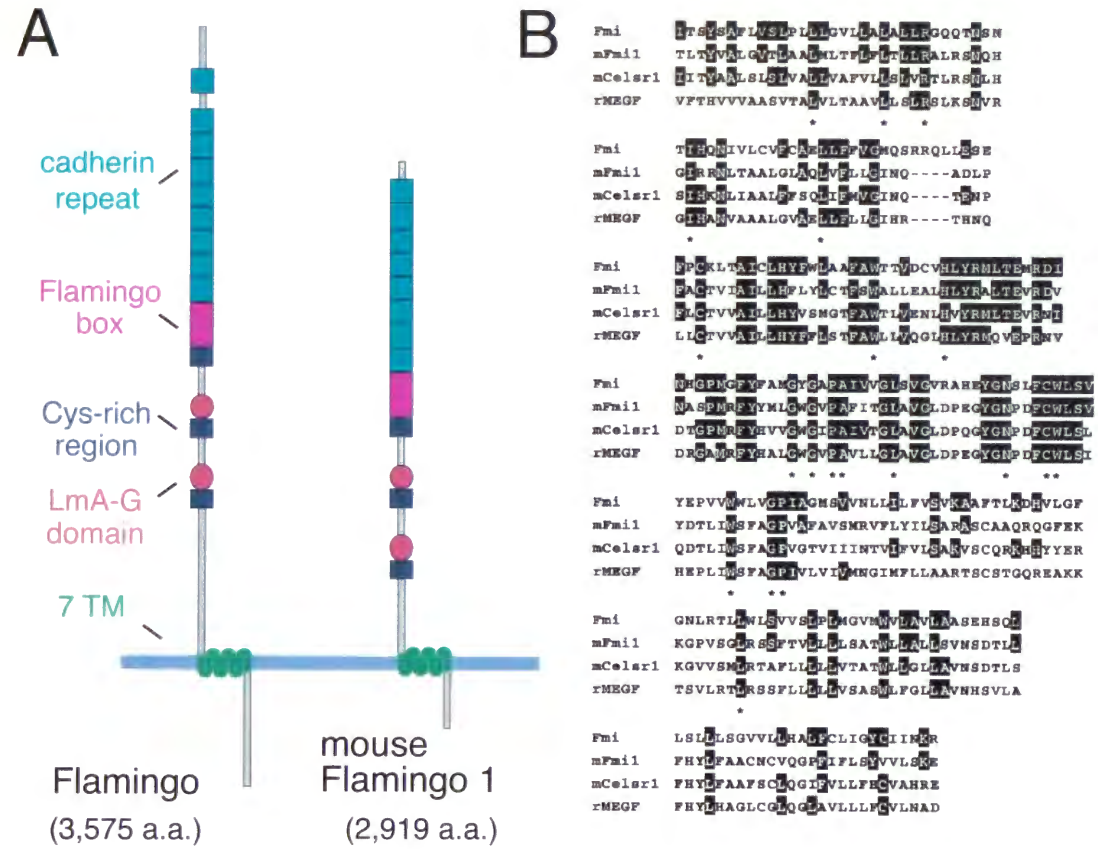


Fig. 2-5 Flamingo 分子の構造

(A) Flamingo および mouse Flamingo 1 の構造模式図。cadherin repeat の数や細胞内領域の配列などの差異はあるが、全体構造はよく類似している。(Cys-rich region: cysteine-rich region, LmA-G domain: laminin A globular domain, 7TM: seven-pass transmembrane segment) (B) ほ乳類の相同分子 (mFmi1, mCelsr, rMEGF2) の 7 回膜貫通領域のアミノ酸配列とのアライメント。Fmi と同一のアミノ酸を塗りつぶしてある。3 番目および 4 番目の膜貫通領域で特に identity が高い。G タンパク共役型レセプターである rat secretin receptor との間でも保存されている残基を \* で示した。また膜貫通領域と推定される領域を太い実線で示した。

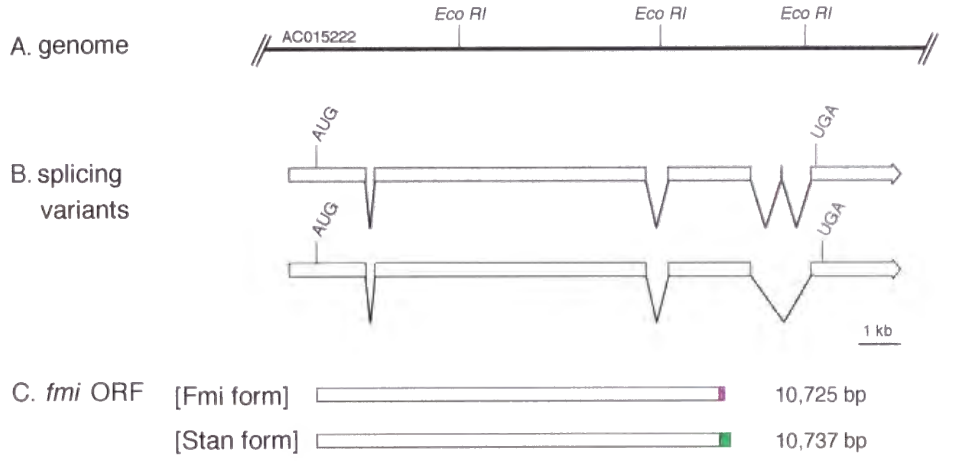




Fig. 2-6 *flamingo* 遺伝子のゲノム構造

ショウジョウバエのゲノムプロジェクトにより解読された、*fmi* 遺伝子周辺のゲノム構造の模式図。(A) ゲノムクローン AC015222 は *fmi* 遺伝子の転写領域のすべてを含んでいる。(B) *fmi* 転写産物は、選択的なスプライシングを受け2つのフォームをとると考えられる。(C) (B) の2つのフォーム由来の2種のポリペプチドは、カルボキシ末端部のアミノ酸配列が異なっている。

### 2-1-3. 胚および3齢幼虫での *fmi* の発現様式

ノザンプロット解析から、胚期に *fmi* の転写活性が高いことがわかる (Fig. 2-1)。つぎに、転写産物の組織分布を明らかにするため、in situ ハイブリダイゼーション法による検出を試みた。検出用のプローブには、Fmi のアミノ末端領域に相当する cDNA クローン No.19 (3.5kb) から作製したセンスおよびアンチセンス RNA をもちいた (Fig. 2-3)。胚発生ステージについては Hartenstein (1993) にしたがった。

解析の結果、*fmi* はおもに神経系と上皮系で発現することがわかった。ステージ12以前の初期胚では、シグナルは認められなかった。ステージ13になると、中枢神経系の多数のニューロンと末梢神経系の一部のニューロンとグリア細胞 (peripheral glia; Nelson et al., 1994; Fredieu and Mahowalt, 1989) でシグナルが見られるほか、表皮全体と気管など上皮系の組織にも弱いシグナルが検出できた (Younossi-Hartenstein and Hartenstein, 1993)。ステージ15まで同様の発現様式を保った後、ステージ16では、末梢神経系のニューロンのシグナルが減少する一方、末梢グリア細胞での発現は維持される。ステージ17以降は、中枢神経系での発現も消失し、末梢でも exit glia のみで発現されるようになる (Fig. 2-7, 2-10)。3齢幼虫の中枢神経系および成虫原基では、食道神経節 (脳) 内の一部の領域で強い発現が認められ、眼原基の視神経細胞と思われる細胞でシグナルが検出できた (Goodman and Doe, 1993; Jan and Jan, 1993)。また翅原基や肢原基で弱いシグナルが認められた。

### 2-1-4. Fmi の翻訳後切断と複合体形成

Fmi 分子の生体内での役割を検討していくには、細胞内でのタンパクの分布状態や各発生段階での分布の変化を知ることが必要であろう。また翻訳後の修飾反応によって活性が制御されるような場合も想定される。このような解析を進めるのには、Fmi

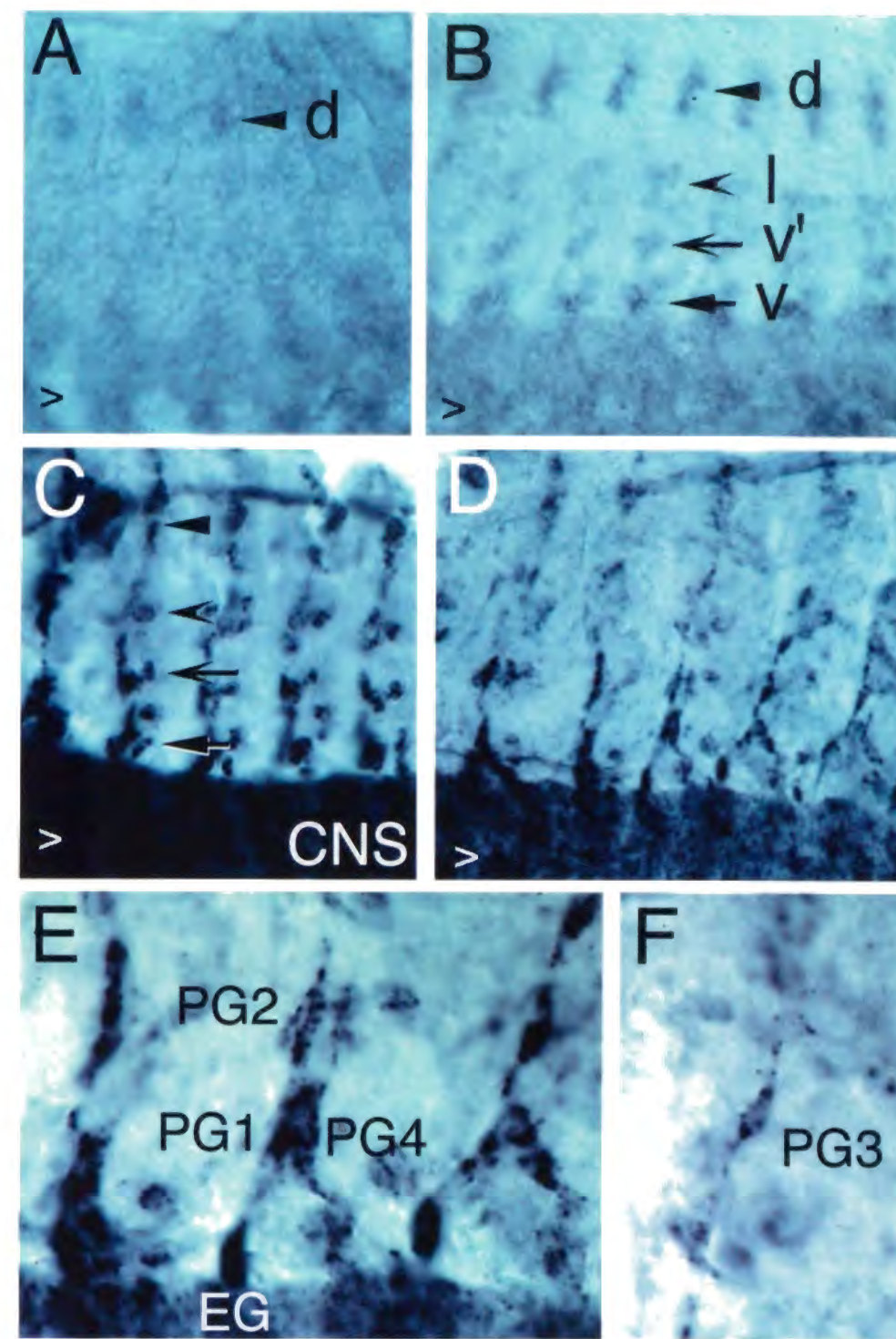


Fig. 2-7 胚期における *flamingo* の発現パターン

(A) RNA in situ hybridization 法により発現パターンを解析した。ステージ13の胚では、表皮全体に弱いシグナルが認められ、また中枢および末梢神経系の分裂中もしくは分裂を終えた神経細胞に比較的高いシグナルを検出できる。(B) ステージ14になると表皮のメッセージレベルは低下するが、神経系では引き続き発現が維持される。(C) ステージ15。ほとんどすべての神経細胞で発現しているのがわかる。気管の細胞にもシグナルが認められる。(D, E and F) ステージ16。神経系のシグナルも次第に低下し始める。しかし、末梢のグリア細胞の一部では、ステージ17まで発現が続く。(d: dorsal cluster, l: lateral cluster, v/v': ventral cluster, > : 正中線, PG: peripheral glia, EG: exit glia)



を識別可能な特異的抗体が不可欠である。そこで Fmi の細胞外および細胞内の一部の領域を抗原に用いてラットに免疫し、複数の抗血清を得た。また細胞外領域に対するモノクローナル抗体を樹立した。以後の解析に主に用いる抗体は、細胞外領域に対する抗血清 CR3-9A、モノクローナル抗体 #71 および #74 と、細胞内領域に対する抗血清 C1-5A である。

アミノ酸配列から予想される Fmi の分子量はおよそ 400 kDa である。ところが野生型胚の粗抽出物に対するウエスタンブロッティング解析では、全長分子と思われる 400 kDa 程度のシグナル強度のかなり弱い分子のほかに、細胞外領域に対する抗体が約 300 kDa のポリペプチドを、細胞内に対する抗体は約 100 kDa の断片をそれぞれ認識した。複数の抗血清で同様のバンドパターンがみられたことから、大多数の Fmi タンパクは翻訳後に切断反応を受けていることが予想された (Fig.2-3)。

ほとんどの分子が2つ (あるいは3つ以上) に分割されて、いったいどのように機能しうるのだろうか。各断片が生体内でどのような関係にあるのかを調べるために免疫沈降を行い、断片同士の物理的な結合状態を検討した。胚粗抽出物に対して細胞外および細胞内領域に特異的な抗体 CR3-9A、#71、C1-5A により免疫沈降したところ、いずれの場合にも細胞外領域由来の 300 kDa 断片と細胞内領域を含む 100 kDa 断片とが共沈した。これは、分子内で切断された各断片が直接的にまたは他の分子を介して間接的に結合していることを示唆している。Fig. 2-9C にあるような結合の様式が想像できるだろう。同様の翻訳後切断反応が *DN-cadherin* でも起こっていると予想されており、共通した意味があるのかもしれない (Iwai et al., 1997)。ただし、マウスのホモログ分子 mFmi1 では翻訳後切断は検出できていない (Shima et al., 未発表データ)。

2-1-5. 胚期における Fmi タンパクの分布

細胞外および細胞内領域に対する抗体を用いて Fmi タンパクの分布を検討したところ、いずれの抗体でもほぼ同様のパターンのシグナルが観察されたので、以後は細胞外領域に対する抗体を用いた。mRNA の発現と同様、ステージ 13 以降の胚の神経系と上皮系の組織にタンパクが検出できる。中枢神経系ではニューロパイル全体に強いシグナルがみられることから、ほとんどのニューロン由来の軸索の細胞膜上に Fmi が分布していると予想される (Fig.2-10)。また、ニューロンの細胞体にも比較的弱いシ

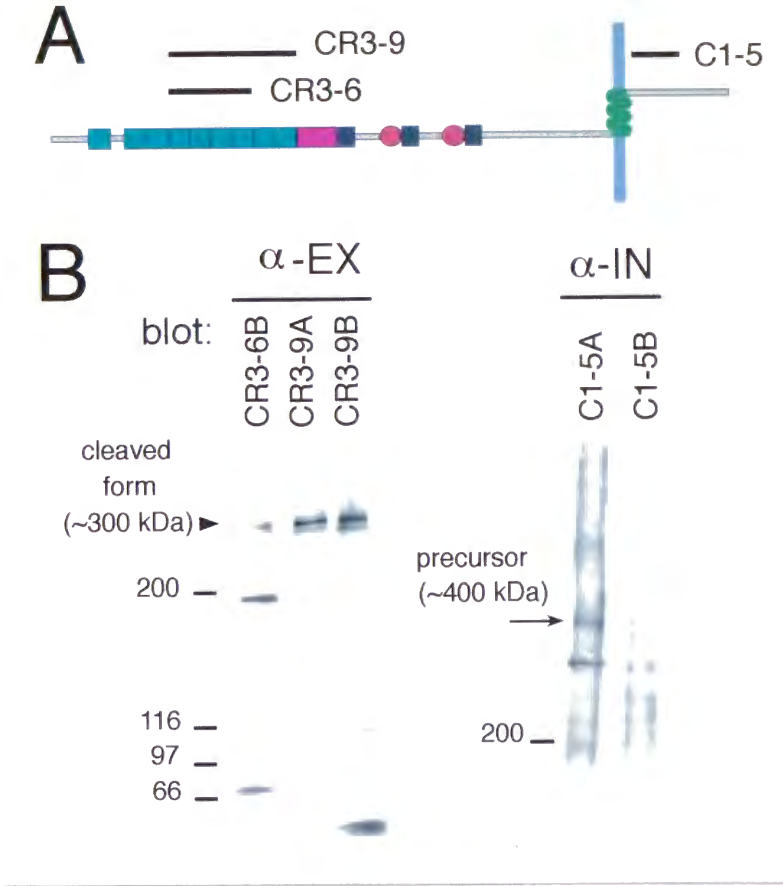


Fig. 2-8 Fmi に対する特異的な抗体の作製  
(A) 融合タンパク質を作製して抗原に用いた領域を示す。(B) ラットに免疫して得られた抗血清によるウエスタンブロッティング解析。胚抽出物中に特異的なバンド (precursor および cleaved form; 詳細は本文) が認められる。

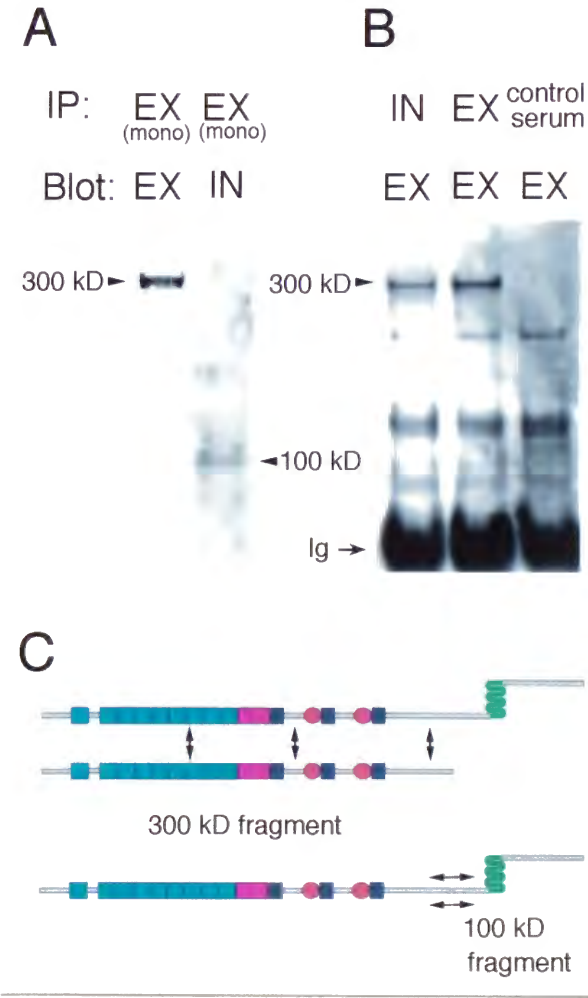


Fig. 2-9 Fmi がうける翻訳後切断  
細胞外領域を認識する抗体は、胚の抽出物中に予想 (~400 kDa) よりも短いポリペプチド (~300 kDa) を認識する。(A and B)  $\alpha$ -EX 抗体および  $\alpha$ -IN 抗体による免疫沈降物中に、それぞれ細胞内領域を含む断片と細胞外領域を含む断片とが含まれていた。これは Fmi が矢印の部位で切断され、切断後の断片が何らかの相互作用していることを示唆する (C)。(EX(mono): #71,  $\alpha$ -EX: CR3-9A,  $\alpha$ -IN: C1-5A, control serum: rat normal serum)



グナルが観察される。末梢神経系でも、細胞体の膜表面にドット状に Fmi が分布している像がみられた (Fig. 2-11)。また、末梢のグリア細胞の表面にもタンパクが分布していた。上皮系では、表皮全体のほか後腸上皮や気管上皮において、細胞境界や細胞の頂部側 (apical) の自由表面にタンパクの分布が認められた。なお、ここで見られたシグナルについては、*fmi* 遺伝子を完全に欠損している *Df(2R)17* および *Df(2R)E3363* のホモ接合体で完全に消失することを確認した (データは示さない)。

#### 2-1-6. Fmi による細胞集合塊の形成

ホモフィリックな分子間相互作用に関ると考えられるカドヘリンリピートを持つことから、Flamingo にも細胞の集合塊を誘導するような活性があると期待された。それを検証するため、ショウジョウバエの培養株細胞である S2 細胞に Fmi の全長もしくは細胞外領域を欠く改変分子  $\Delta$ EX を発現させ、集合塊の形成能を調べた。その結果、全長分子を発現させた場合のみ集合塊が形成された (Fig. 2-12)。細胞外領域を欠く改変分子を発現させた場合には集合塊を形成しなかったことから、Fmi は細胞外領域のカドヘリンリピートを介してホモフィリックに相互作用する活性があると考えられる。

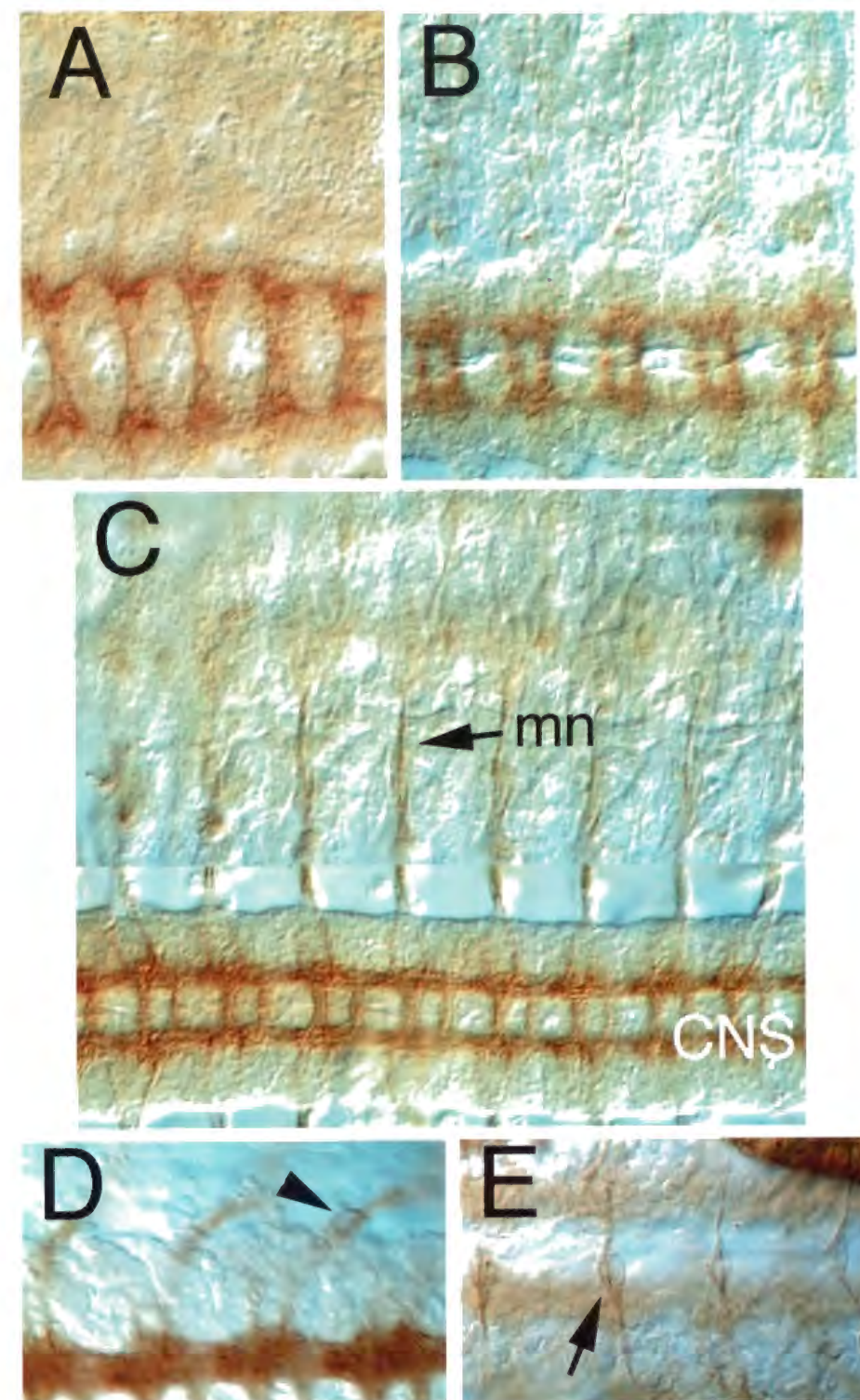


Fig. 2-10 胚期における Flamingo タンパクの局在 (1)

(A) 細胞外領域を認識する抗体 CR3-9A による抗体染色法により Fmi の分布を調べた。ステージ 12 の胚では、表皮全体に低レベルのタンパクが存在している。また中枢神経系では、パイオニア軸索を含むほとんどの軸索上にシグナルが認められる。(B) ステージ 14 になると表皮での Fmi 量は低下し、中枢神経系のニューロパイルにおもに分布するようになる。(C) ステージ 16。ニューロパイル全体にシグナルがあるほか、末梢に伸びる運動神経 (mn: motor nerve) にもタンパクの分布がみられる。(D and E) ステージ 17。末梢のグリア細胞での分布。矢じり (D) は exit glia であり末梢の神経束が腹部神経節を離れる位置に存在する。exit glia の細胞膜表面に Fmi が分布しているのがわかる。(E) は dorsal median glia と呼ばれる細胞で、腹部神経節の背側に位置する。transverse nerve の基部を包むグリア細胞であり、その表面に Fmi が局在している。



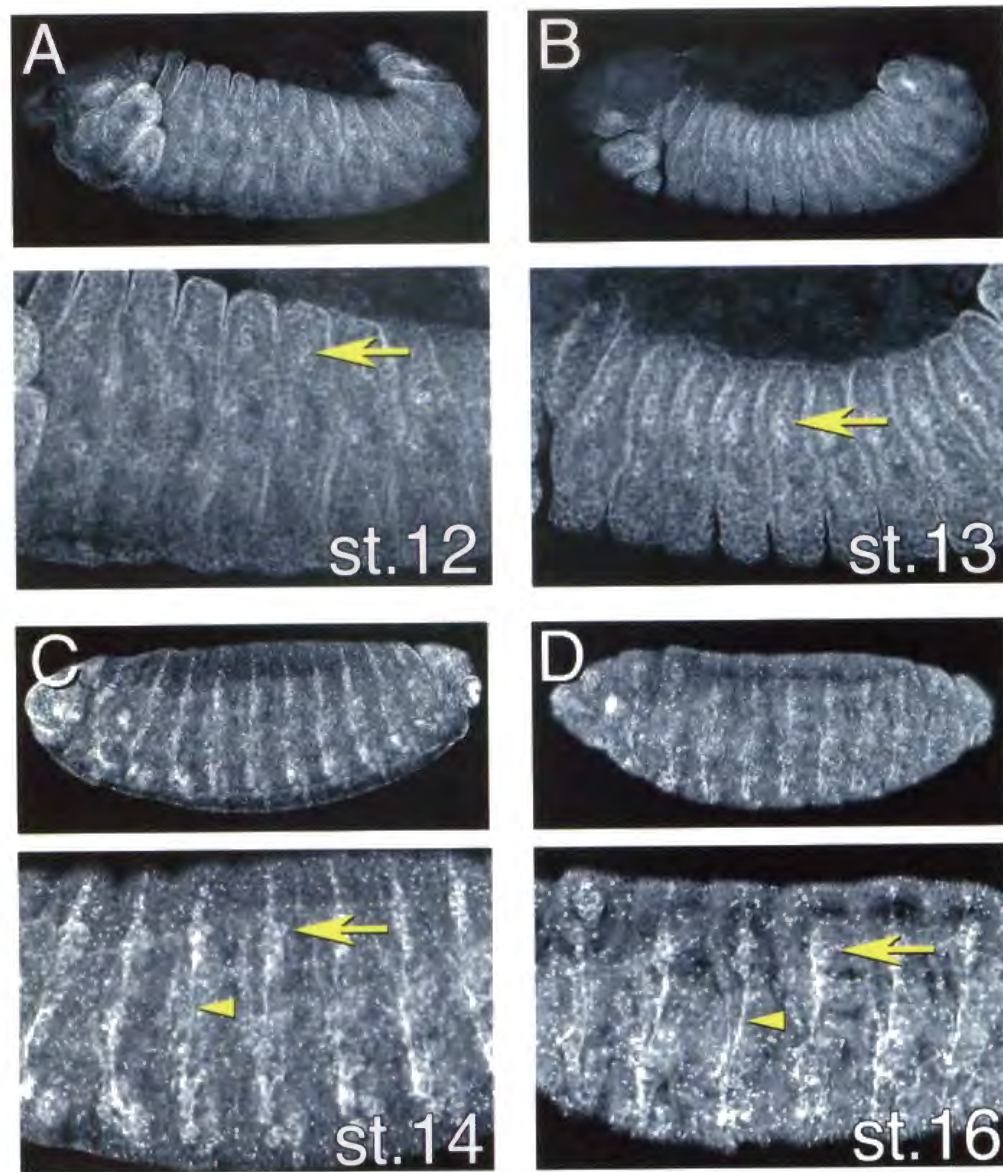


Fig. 2-11 胚期における Flamingo タンパクの局在 (2) (A) 末梢神経系でのタンパクの分布を追跡した。ステージ 12 では各半体節ごとに末梢神経系の神経細胞と思われる細胞群にシグナルが検出できる。(黄色矢印) また表皮全体にタンパクが存在している。(B) ステージ 13 になると、dorsal cluster になる細胞群に強いシグナルがみられるようになる。(C and D) ステージ 14 以降では、末梢神経系のほとんどすべての神経細胞の細胞体と軸索の膜上に Fmi が分布している。

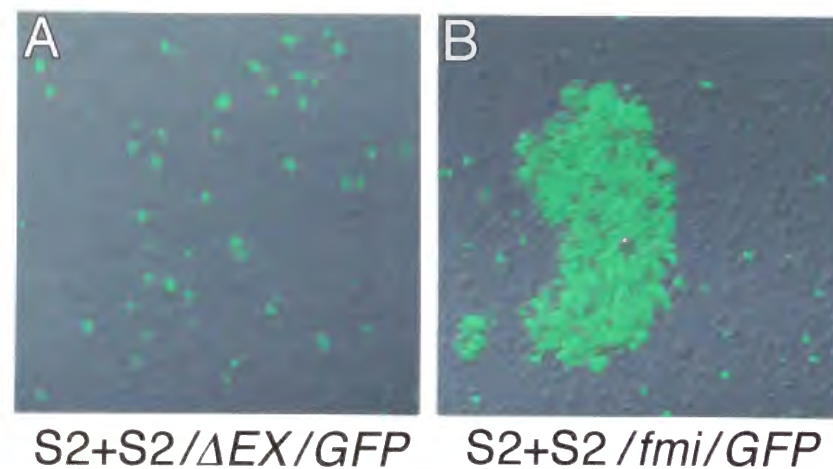


Fig. 2-12 Fmi による細胞集合実験 Fmi 全長および細胞外領域の大半を欠く分子 ( $\Delta$ EX) とを S2 細胞で発現させたのち、非発現細胞と混ぜて集合塊を形成させた。また、発現細胞は GFP の共発現により標識した。全長分子を発現させたときのみ、集合塊を形成していることがわかる (Zernicka-Gotcz et al., 1996)。

## 2-2. 考察

### 2-2-1. カドヘリンスーパーファミリーの多様性

カドヘリンスーパーファミリー分子の構造と機能の多様性について検討してみる。カドヘリンスーパーファミリーに属する分子は、カテニンと呼ばれる一群の細胞質分子と相互作用して強固な接着活性を示すクラシックタイプと、それ以外のノンクラシックタイプとに大別されている。本研究以前の研究では、カドヘリンスーパーファミリーに属する分子いずれもは 1 回膜貫通分子もしくは GPI アンカー型膜表面分子のいずれかであった。

クラシックタイプの分子は、細胞外領域のカドヘリンリピートを介してホモフィリックな分子間相互作用をし、細胞質領域を介してカテニンと相互作用している。しかしながらノンクラシックタイプに属する分子については、ホモフィリックな相互作用も含めて分子機能について未知のものが多かった。しかし、一部についてはようやく機能が明らかになりつつある。例えば、ショウジョウバエ *fat* はガン抑制遺伝子としての機能を持つと考えられているし (Mahoney et al., 1991)、また ショウジョウバエ *ds* は付属肢の遠近軸のパターン形成に必須の因子であるとされている (Clark et al., 1995)。また、マウス CNR は細胞質領域で非レセプター型キナーゼの Fyn と結合することが知られていたが、最近になって神経細胞の移動を制御する分泌因子 Reelin の機能的なレセプターであるとの報告がなされた (Senzaki et al., 1999)。ノンクラシックタイプの分子群の機能が解明されていくことで、カドヘリンスーパーファミリーの未知の役割が明らかになっていくことが期待される。

### 2-2-2. Flamingo ファミリー分子の機能

Fmi のホモログはヒト、マウス、ラットおよび線虫に存在することが報告されている。いずれの分子についても、機能を示唆するような直接的なデータはないが、マウスのホモログ分子 mCelsr1 については胚発生初期における発現パターンの解析がなされている (Hajantnakis et al., 1998)。発生中の中枢神経系において、多くの神経細胞で発現していることから Fmi との機能的な共通性があるかもしれない。また、少なくとも mFmi1 については平面内細胞極性をもつ内耳の有毛細胞 (inner hair cell) にも発現が

認められている (Shima et al., 未発表データ)。近年、多種多様な 7 回膜貫通型分子が発見されており (Bockert et al., 1999)、三量体 G タンパクとの共役して生体内で未知の機能を発揮しているのではないかと想像されている。Fmi 自身が三量体 G タンパクと共役しているという証拠はないが、進化上保存された重要な機能を持つことが期待される。

第 3 章



第 3 章. 神経系の発生過程における Fmi の機能解析

3-0. はじめに

精緻な神経回路網の形成は、軸索のガイダンスが正確に進行しつつ、かつ樹状突起のパターン形成が高度に調和のとれた制御を受けることで始めて成功しうる複雑な形態形成運動である。神経突起の形成においては、成長円錐が周囲の細胞との間で接触的なもしくは非接触的なコミュニケーションを持続し、適切に振る舞うことが重要である。こうした細胞間の認識にかかわる膜貫通分子が現在までに数多く報告されている (Goodman and Shatz, 1993)。しかし、それでも例えばある一つの成長円錐について、ある瞬間における挙動を完全に説明できるわけではない。この現象に対するより深い理解を得るためには、細胞間認識分子による細胞間の情報交換のメカニズムと、細胞骨格系の動態を制御して細胞の形態を調節するメカニズムとを体系的に解釈していくことが要求される (Tanaka amd Sabry, 1995)。

このような観点から見て、Flamingo (Fmi) の一次構造から予想される多機能性は興味深い。細胞外領域での分子間の相互作用と、7回膜貫通領域を介した細胞内でのシグナル伝達系の制御の両方に直接関与しうると想像できるからである。Fmi が成長円錐の挙動の制御にかかわる分子の候補と考え、生体内における機能解析を進めた。そのために、まず *fmi* 突然変異体を分離しその表現型を検討した。その結果、軸索走行や樹状突起形成のいくつかの側面において、Fmi の活性が必要であることが明らかになった。また、後に述べるように *fmi* は上皮細胞の極性形成にも必要である。そこで、ニューロンの細胞体の極性と軸索走行の関連についても検討した。

3-1. 結果

3-1-1. *fmi* 変異体の分離

*fmi* 変異体の探索

平野らの解析から、*fmi* 遺伝子は第 2 染色体右腕の 47B 領域に位置していることがわかっていて (Hirano, 1992; Fig. 3-1A)。*fmi* が生存に必須な遺伝子であるとする、この染色体領域にマップされる致死変異系統の中に *fmi* 変異体の候補が存在すると思われる。

Burgess と Schwarz は、47B 領域にある遺伝子 *rab3A* の変異体を分離する目的から、47A から 47E/F におよぶ染色体領域を欠いている染色体欠失 *Df(2R)17* と相補しない劣性致死変異系統を 234 株樹立していた。*Df(2R)17* のホモ接合体胚では中枢神経系での Fmi のシグナルがみられないことから、この染色体欠失が *fmi* 遺伝子の活性を欠いていることが確認できた (Fig. 3-1B)。そこで、この致死変異体のコレクションのなかに *fmi* 変異体の候補が含まれていることを期待した。

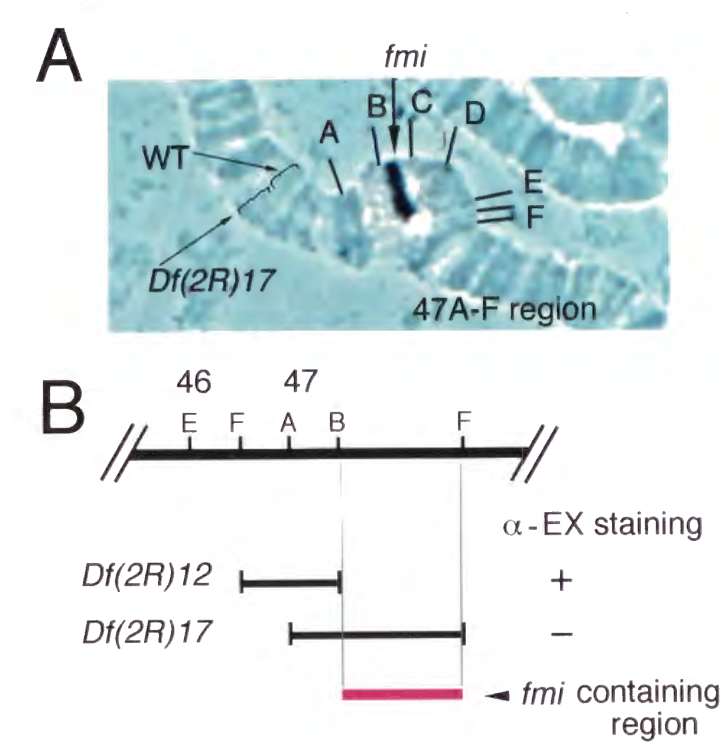


Fig. 3-1 *fmi* 遺伝子は 47B 領域にマップされる (A) *fmi* cDNA をプローブにして、染色体上での in situ ハイブリダイゼーションを行い、*fmi* 遺伝子のマッピングを試みた。*fmi* 遺伝子が第 2 染色体右腕の 47B 領域に位置しているのがわかる。同時に、染色体欠失 *Df(2R)17* では *fmi* 遺伝子を含む大きな領域が完全に欠損していることもわかる。本来 polyten 化した相同染色体同士は接着しているが、野生型染色体の 47A-47E 領域は対合できずにたわんでいる。(B) 上段に唾腺染色体地図を示した。その下に、各染色体欠失において欠失している領域を実線で示した。染色体欠失 *Df(2R)12* と *Df(2R)17* のホモ接合体胚を抗 Fmi 抗体により抗体染色したところ、*Df(2R)17* のみにおいて中枢神経系でのシグナルが完全に消失した。このことから、*fmi* が図に示した領域に位置することが示唆される。



*fmi* 変異体の候補の選別には、抗 Fmi 抗体による抗体染色を利用した。*fmi* 変異系統の中には Fmi タンパクが全く生成されなかったり、また生成されても不安定ですみやかに分解されてしまうような変異が含まれるかもしれない。このような変異は、ホモ接合体の胚での抗体染色パターンに影響を与えることになり、それを指標に選別することが可能であると期待された。そこで 234 系統のコレクションのうち 72 株を任意に抽出して抗体染色したところ、7 系統について、ホモ接合体と思われる胚で神経系での染色パターンに異常が認められた (Fig. 3-2)。このうちの 1 系統 E42 を *fmi* 変異体の候補と考え、コレクションに属するすべての系統との間で、致死性についての相補試験を行った。その結果、計 31 系統からなる相補群を同定し、それらが *fmi* 変異体であることが強く示唆された。また 31 系統のうち計 17 系統が染色パターンの異常を示した。相補試験の結果と合わせて別表に示す (Table-1)。

#### 分子レベルでの変異の同定

分離した *fmi* 変異体の候補が実際に *fmi* 遺伝子上に変異を持っていることを確認するため、変異による分子レベルでの影響を直接同定することを目指した。まず変異体で産生される Fmi タンパクの異常を検出するため、ヌル変異体の粗抽出物中の Fmi の総量と分子量を調べた。その結果、E45 ホモ接合体では SDS-ゲル上の移動度には変化はないが分子の総量が減少しているようであった。一方、E59 では本来は存在しない低分子量のポリペプチドが少量ながら認められた (Fig. 3-3B)。このことから、E45 では転写や翻訳の活性が減少したり、タンパクの安定性が低下していると考えられる。一方、E59 ではナンセンス変異やフレームシフト変異などが原因で短いポリペプチドが生成されていることが予想された。

分離した点突然変異体は、もともと化学変異原であるエチルメタンスルホネート (EMS) 処理による塩基置換を誘発されている。そこで、*fmi* 遺伝子のコーディング配列上の変異を探索することにした。変異体由来の mRNA を鋳型にした RT-PCR 法により変異型の cDNA を増幅し、オープンリーディングフレーム内の塩基配列を決定して野生型の配列と比較した。その結果、E45 では 1,849 番目のバリン残基がアスパラギン酸残基に置き換わるミスセンス変異 (GTT → GAT) を、E59 では 1,838 番目のグルタミン酸残基が終始コドンに置き換わるナンセンス変異 (CAA → TAA) をそれぞれ同定

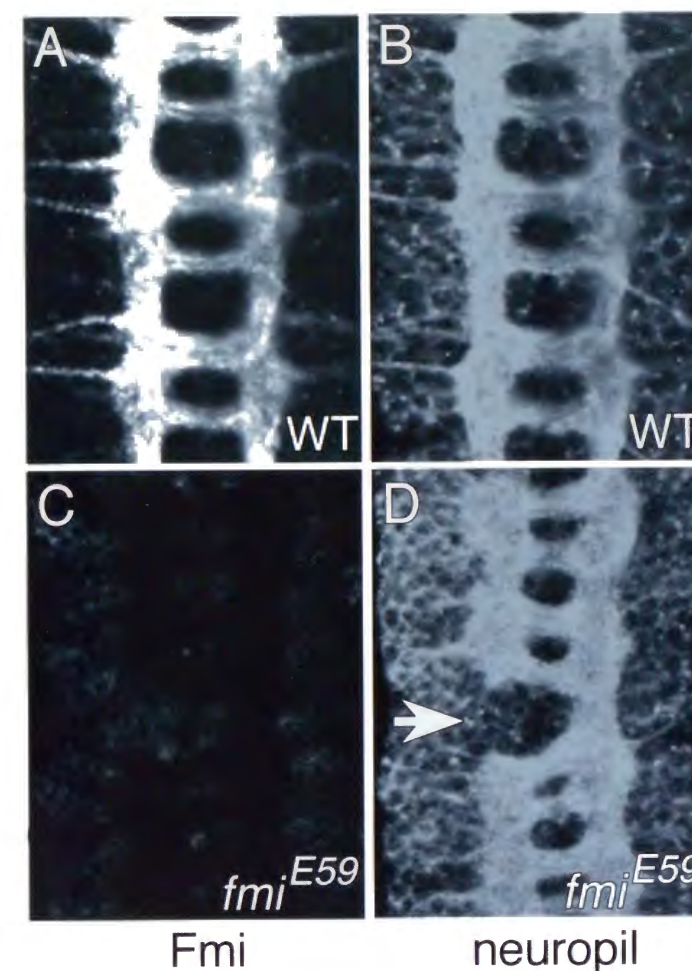


Fig. 3-2 抗体染色法による *fmi* 変異体の探索

47B 領域に存在する必須遺伝子の変異体 234 系統のうち任意の 72 系統を、抗 Fmi 抗体 CR3-9A で抗体染色した。(A) 野生型胚のニューロパイルのマーカークラシカル抗体による染色像。(B) 野生型胚の抗 Fmi 抗体による染色像。ニューロパイルに Fmi が濃縮している。(C) 致死変異系統 E45 の胚の抗 HRP 抗体による染色像。前後方向の軸索束 (longitudinal axon fascicle) に大規模な断裂がみられる。(D) 致死変異系統 E45 の胚では、Fmi 分子はニューロパイルにはほとんど存在せず、細胞体にわずかにシグナルが検出されるだけである。

した (Fig. 3-3A)。突然変異 E45 では、アミノ酸置換によってタンパクの安定性が低下し、産生された後速やかに分解されたものと考えられる。

#### *fmi* 変異体の致死性と行動異常

*fmi* アレルの多くはホモ接合体が生存可能な成虫にまでは成育できず、E86、D33、D77 の 3 アレルについてのみ予想される個体数の 1-5 % 程度のホモ接合体の成虫が出現した。そこでまずヌル変異と考えられる E45 と E59 について、どの発生段階で致死となるのかを検討した。どちらのアレルでもホモ接合体は胚発生後期まで発生し顕著な形態異常は観察されなかった。しかし、胚発生後期には正常ならば胚は頻りに蠕動運動を繰り返すのに対し、ホモ個体は孵化する直前の時期になってもほとんど動かずに死んでしまうことがわかった。一方、E86 および D33 のホモ成虫は、翅を下垂させたり肢を痙攣させたりして、非協調的な行動パターンをとる。したがって、*fmi* 変異



体では神経系や筋肉に構造的もしくは機能的な異常が生じている可能性が高いと予想された。

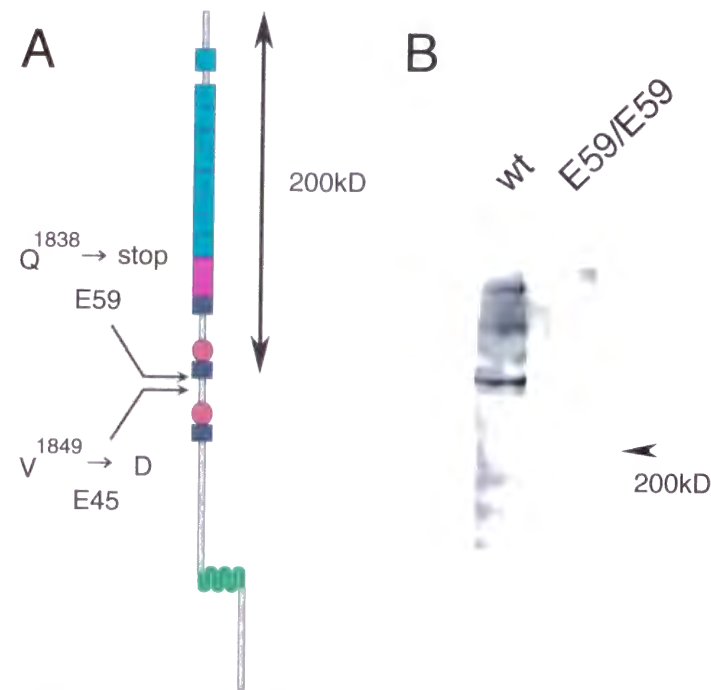


Fig. 3-3 *fmi* ノル変異体 E45 および E59  
(A) E45 および E59 において、*fmi* 遺伝子のコーディング配列中にアミノ酸置換を伴う塩基置換を同定した。E59 はナンセンス変異であり、変異型分子が産生されることと矛盾しない。(B) E59 ホモ接合体中には、変異型の Fmi 分子と考えられる約 200 kDa のポリペプチドが検出できる。

### 3-1-2. 胚中枢神経系での軸索走行異常の解析

#### *fmi* 変異体は軸索の走行異常を示す

ヌル変異体に加えて、E66 について、中枢神経系の軸索走行にみられる表現型を追及した。E66 のホモ個体では EX 抗体のエピトープを持つ分子が野生型と同様のパターンで分布している。まず、すべての軸索束を染め出すマーカー抗体である抗 HRP 抗体により中枢神経系のニューロパイルの全体像を視覚化した (Jan and Jan, 1982)。E45 および E59 のホモ接合体とそれらのトランスヘテロ接合体では、ステージ 17 の後期胚の軸索束のうち前後方向の軸索束 (longitudinal axon tract) が 1 個体当たり 1 ケ所程度の頻度で断裂していた (Fig. 3-2)。また E66 のホモ接合体ではニューロパイルの遠近軸方向の幅に凹凸が生じ、波打つような形態をとっていた。軸索束全体の形態からは、個々の軸索の挙動を追跡することは困難である。E66 でよりシビアな表現型が観察されるのは、変異型のタンパクが多量に産生されていることが原因かもしれない。

より解像度よく異常を調べるため、軸索束のサブセット特異的なマーカーを利用した。まず longitudinal axon tract のうち、数本の軸索からなる 3 本の軸索束のみを染め出す抗 Fasciclin II (Fas II) 抗体を用いた (Fig. 3-4A)。ヌル変異体では、抗 Fas II 抗体陽性

の軸索が一部の体節で断裂する異常に加えて、伸長方向を誤って側方に軸索束を突出させたり別の経路の軸索と異常な束形成をしていることがわかった (arrows in Fig. 3-4B-D)。また E66 では、ほとんどすべての体節で軸索束が波打っており、特に最も側方に位置する経路にそった軸索束の異常が顕著であった。また軸索束の終末部が塊状になっている像がみられた。このような異常の原因としては、パイオニア軸索の走行異常と後続の軸索の束形成／伸長異常とが考えられる。この差異を見極めるためにパイオニア軸索が伸長するステージ 13 での表現型を検討した。パイオニア軸索の一部は同定可能でかつ Fas II を発現している。たとえば運動ニューロンである aCC ニューロンや RP3 ニューロンなどである (Landgraf et al., 1996)。ヌル変異体では、これらの同定可能な軸索群はほぼ正常に走行していた。データは示さないが、特異的なパイオニア軸索マーカーである抗 Connectin 抗体や抗 Fasciclin III 抗体 (Patel et al., 1987) を利用しても異常は検出できなかった。したがって、後期胚でみられた異常は、主に後続の軸索が正しい経路選択や伸長ができなかったことによると結論づけた。

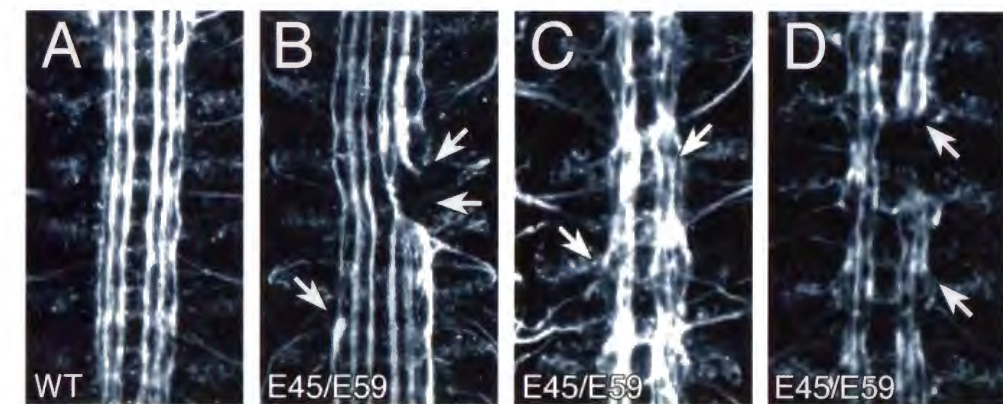


Fig. 3-4 胚中枢神経系での Fas II 陽性軸索の走行パターン異常

(A) 野生型胚のステージ 17 における Fas II 陽性軸索の走行パターン。正中線を挟んで左右にそれぞれ三本ずつの軸索束が前後方向に走行している。(B, C, D) ノル変異 E45 と E59 のトランスヘテロ接合体での Fas II 陽性軸索の走行パターン。白矢印が示すような異常が高頻度に見られた。軸索の伸長が停止したり隣接する軸索束が融合することや (B)、軸索束が側方に突出してしまう走行異常 (C, D) がわかる。ただし、シビアな表現型を示す個体とマイルドな表現型を示す個体がみられた。

次に Fas II を発現していない別のサブセットの後続軸索の挙動を調べるため、トランスジェニック系統 *apC-tau-lacZ* を利用した。この系統は転写因子 *apterous* (*ap*) の発現調節領域の一部を使うことで微小管結合タンパク Tau と  $\beta$ -Gal との融合遺伝子を半体



節当りわずか3つの同側性介在ニューロンで特異的に発現させ、その軸索をラベルすることが可能である (Lundgren et al., 1995)。このマーカーをもつヌル変異体での軸索の走行パターンを調べたところ、まったく正常とっていい経路を通っていた (data not shown)。この結果は、*fmi* がほとんどのニューロンで発現しているにもかかわらず、必ずしもすべてのニューロンで必須の役割を果たしているわけではないことを意味している。しかし、実際にどの特定のニューロン由来の軸索の走行を制御し、さらにどのようなプロセスに影響を与えているかについて考察することは困難である。

### *fmi* cDNA の強制発現による表現型の回復

*fmi* 変異体でみられた異常が *fmi* 変異に依存したものであること、さらに致死の原因が神経系の形態的な異常によることを示すためにトランスジェニックによるレスキューを試みた。ニューロプラストが誕生する時期から神経系で広範に発現を誘導できる *GAL4* 系統である *GAL4-1407* を用いて、*fmi* cDNA をヌル変異体で強制発現させた (Brand and Perrimon, 1993; Luo et al., 1994)。その結果、予想される個体数の約 30 % に相当する数のトランスヘテロ変異体の成虫が出現した。また、後期胚の中樞神経系の異常も大部分が回復し、ほぼ野生型の形態をとっていた (Fig. 3-5)。しかし、レスキューされた成虫は運動性が極めて低く、神経系に形態異常がいくつか観察された (後述)。したがって発現の量や組織特異性あるいは発現のタイミングなどが、必ずしも十分なものではないと想像できる。

### 3-1-3. 胚末梢神経系での神経突起パターン異常の解析

#### Fmi は末梢ニューロンの軸索伸長を制御している

*fmi* は末梢神経系のニューロンでも発現し、軸索上にタンパクが分布していることから (Fig. 2-11)、末梢から中枢へ向かう軸索の走行にも関与していることが予想された。末梢神経系の細胞は少数の細胞群からなるクラスターを形成しているため、個々の細胞を識別できるような高い解像度の観察ができるという特長をもつ。また、モノクローナル抗体 22C10 は中枢神経系のいくつかの介在ニューロンに加えて、すべての末梢神経系のニューロンの細胞体と軸索を可視化できる。このマーカーを利用して、

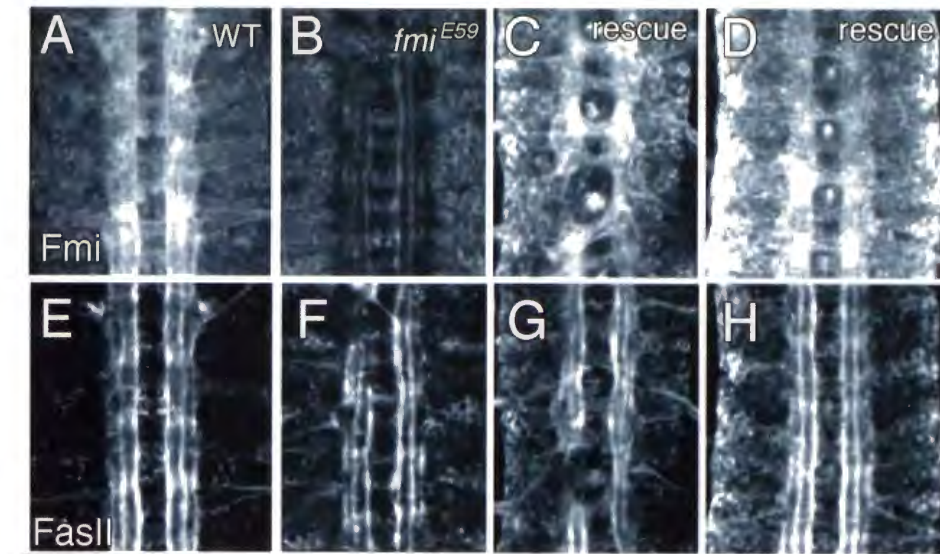


Fig. 3-5 *fmi* cDNA の強制発現による軸索走行異常の回復 (A-D) Fmi のタンパクの分布。(E-H) Fas II 陽性軸索の走行パターン。(A, E) 野生型胚。(B, F) ヌル変異 *E59* での軸索走行の異常。高頻度に軸索伸長が停止しているのがわかる。(C, G) 神経特異的に Fmi を発現させたレスキュー個体。高頻度の伸長停止はみられないが、軸索束の断裂はみられる。(D, H) 別のレスキュー個体の例。Fmi の発現により、ほぼ野生型と同等の正常な軸索走行パターンを示している。

末梢神経の軸索または軸索束の走行パターンを調べたところ著しい異常は検出できなかった。また細胞体の位置も正常であった (Fig. 3-6A, B)。

中枢神経系の場合と同様に、少数の神経細胞に由来する軸索のサブセットを観察できれば何らかの異常が見つかるのかもしれない。実際、末梢神経系の軸索伸長異常を示す変異体として分離されていた *guillotined (gui)* 変異が *fmi* の突然変異であることが、相補試験の結果明らかになった。*gui* 変異体でも 22C10 染色像は野生型のものと区別できないが、lateral cluster の CH ニューロン (neurons of chordonal organ) の軸索束だけを特異的に標識すると、軸索伸長が途中で停止してしまう表現型が高頻度にみられることが知られている (Kolodziej et al. 1995; Fig. 3-6C, D)。



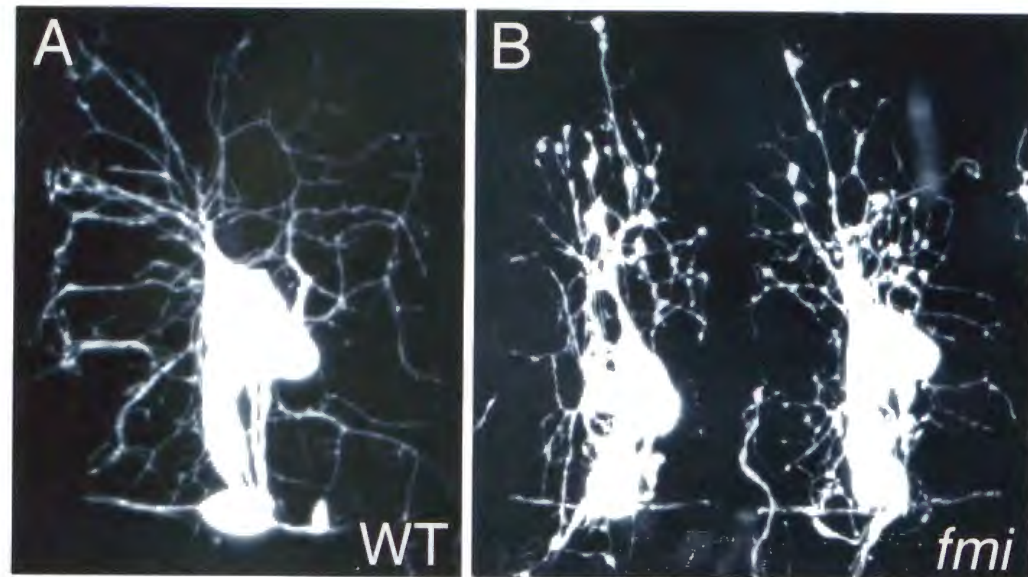


Fig. 3-8 背側クラスターの多極性神経細胞の樹状突起のパターン異常 (1)

背側クラスターに含まれる7個の多極性神経細胞由来の樹状突起をGFPにより標識した。(左)野生型胚の樹状突起のパターン。上が背側、左が前側。(右) *fmi* ノル変異体の樹状突起のパターン。背側方向に過剰に伸長したり、前後方向の広がり狭まっているように見える。

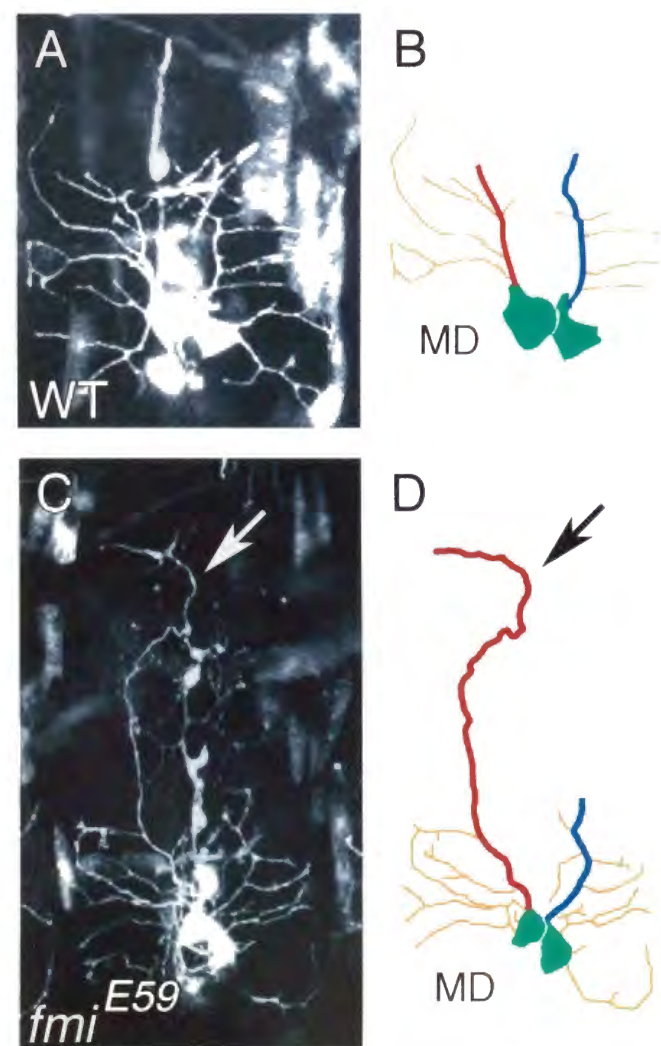


Fig. 3-9 背側クラスターの多極性神経細胞の樹状突起のパターン異常 (2)

背側クラスターに含まれる2個の多極性神経細胞由来の樹状突起をGFPにより標識した。(A)野生型胚での樹状突起のパターン。(B)に図示したように、それぞれのニューロンからは一本の比較的太い一次突起が伸長し、そこから細い二次突起が前後に展開している。(C) *fmi* ノル変異体の樹状突起。(D)に図示したように、一次突起が交叉してしまうことがある。また、背側方向に過剰に伸長することが高頻度にみられた。また、二次突起の分枝パターンも正常とは異なっている印象をうける。

を発現させ、表現型の回復が見られるかどうか検討した。その結果、ほとんどの体節の末梢神経細胞で樹状突起の異常な伸長は見られなくなり、二次突起の分岐数も正常に近くなっていた (Fig. 3-10)。このことから、*fmi* は神経細胞で必須の機能を担うが、周囲の組織には必ずしも必要でないことがわかる。Fmi は、例えば樹状突起の伸長を停止させるシグナルに対する応答機構に関与するのかもしれない。ただし、Fmi が間接的に突起のパターンに影響を及ぼしている可能性は残る。例えば、*fmi* 変異体ではニューロンの分裂パターンや相対的な位置関係が異常になってしまい、突起の伸長開始部位が変化してしまう可能性などが考えられる (Fig. 3-11)。

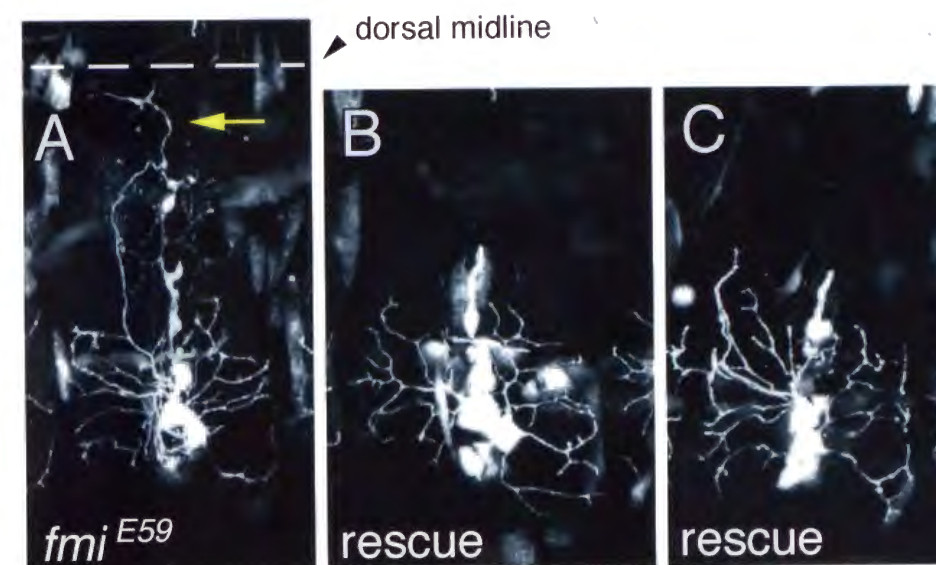


Fig. 3-10 *fmi* は MD ニューロンで細胞自律的に機能している

(A) *fmi* ノル変異体での MD ニューロンの樹状突起のパターン。背側への異常な伸長がみられる (黄色矢印)。(B and C) MD ニューロンで cDNA を強制発現させることによる表現型の回復の検定。GFP を発現させている *GAL4* 系統を利用して同一の細胞群でのみ *fmi* を発現させた。背側への異常な伸長が回復したことから、*fmi* がニューロンにとって必要であることが示唆される。



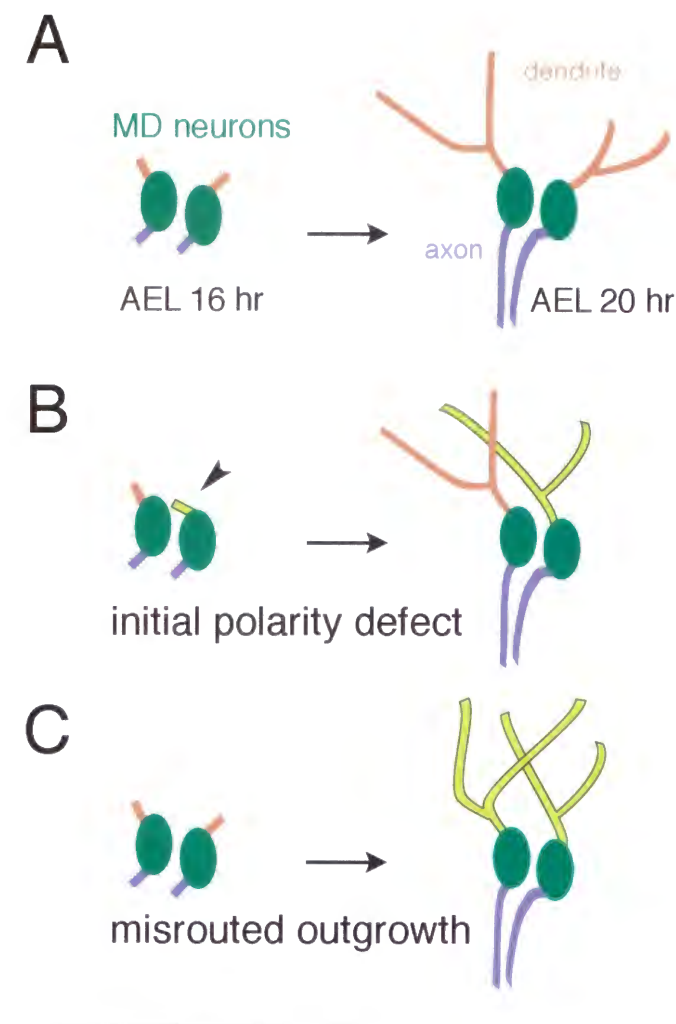


Fig. 3-11 異常な樹状突起パターンの原因  
(A) 野生型での MD ニューロンの樹状突起形成。(B) 樹状突起の伸び始める方向性に異常が生じると、結果的に全体のパターンに大きな影響が現れるだろう。(C) 初期の極性に異常はないが、突起の伸長方向に異常が生じるのかもしれない。

### 3-1-4. R-axon の投射における Fmi の役割

#### ショウジョウバエの視覚系の発生

*fmi* ヌル変異体の胚神経系での表現型解析においては、特に軸索伸長の制御に関して、細胞レベルでの形態異常については十分な解析ができなかった。したがって、*Fmi* の分子機能を推定することは困難である。そこで、より形態観察の容易な変態期の神経発生過程、特に成虫の視神経の軸索投射系での表現型解析を目指した。

ショウジョウバエの複眼 (compound eye) は約 800 個の個眼 (ommatidium) からなり、それぞれの個眼は 8 個の光受容細胞 (photoreceptor cell, R1-R8) を含む。光受容細胞の軸索 (R-axon) は一次中継核である視葉 (optic lobe) に投射している。視葉は 4 つの領域 (lamina, medulla, lobula, lobula plate) からなり、R1-R6 の軸索は視葉表層部の lamina に、R7 および R8 の軸索はより深層部にある medulla に投射している。さらに複眼から視葉への投射パターンは、脊椎動物にみられる網膜-視蓋投射の場合と同様、空間的な位置関係を保存するようないわゆる retinotopic な様式である (Meyerowitz and Kankel, 1978; Martin et al., 1995)。光受容細胞のクラスターの誕生は、眼原基上で最後端の列から順次前側の列へと進行していく。誕生したそれぞれの光受容細胞は、順次軸索を中枢へと伸ばし始める。lamina に到着した軸索は、それより以前に到達していた軸索群のより前方に、ちょうど年輪を重ねるように一列ずつ重層していく (Fig. 3-12)。

R-axon のすべて (もしくは特定の一部) を特異的に標識できる分子マーカーが利用可能であり (Fujita et al., 1982)、感度よく異常を検出できる。また、R-axon の走行パターンに異常を示す変異体が既にいくつも分離されている (Martin et al., 1995)。このような特徴から、(1) 軸索の伸長や束形成、(2) 軸索の経路認識や標的認識、(3) シナプスの形成や成熟過程など神経系の発生において一般的にみられる現象を、軸索一本一本のレベルの解像度で解析できるという卓越した利点をもっている (Garrity et al., 1996; Garrity et al., 1999; Hing et al., 1999)。



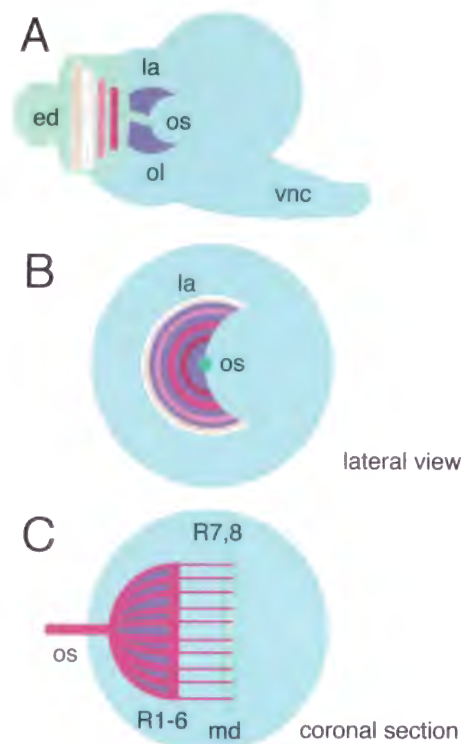


Fig. 3-12 3 齢幼虫後期にみられる視神経の投射パターン

(A) 3 齢幼虫後期の眼原基では、最後部から順に光受容細胞への分化が進行する。つづいて発生運命の決定と共に、各光受容細胞は軸索を伸長させ、視葉に投射していく。(B) 視葉を側面から眺めた様子。光受容細胞の一部 (R1-R6) は視葉の lamina に投射する。この際、後から投射してくる軸索群は、lamina のより前側に順次投射していく。したがって最も周縁部に新着の軸索群が存在するようになる。(C) 視葉を前方から眺めたところ。光受容細胞の一部 (R7 および R8) はより深層の medulla に投射する。(ed: eye disc, la: lamina, md: medulla, ol: optic lobe, os: optic stalk, vnc: ventral nerve cord)

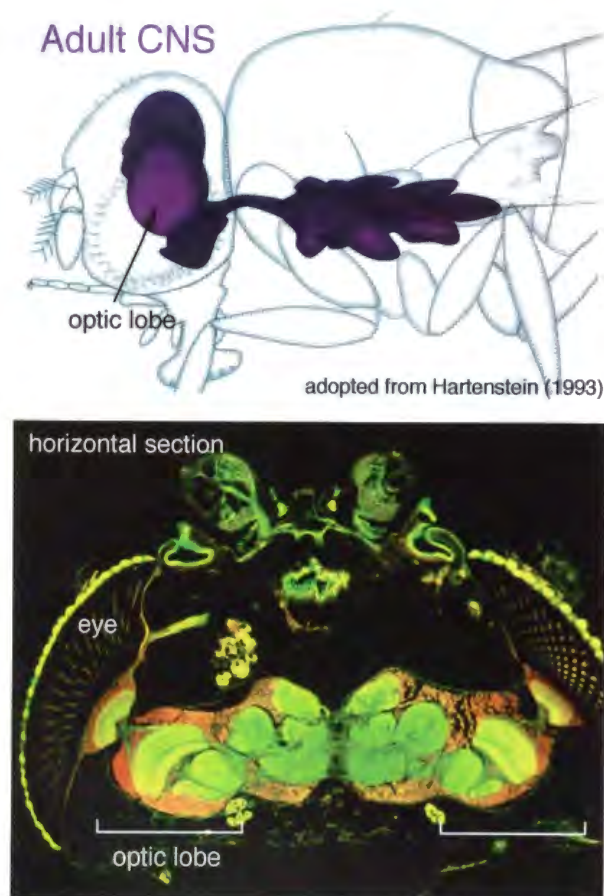


Fig. 3-13 成虫の視覚系にみられる視神経の投射パターン

(A) 成虫の中樞神経系の透視図。頭部にある神経節 (脳) と胸部および腹部神経節がみえている。(B) 頭部の水平断面。光受容細胞の軸索は視葉に投射する。蛹期を経ることで視葉の層構造は大きく変化している。

## 光受容細胞-視葉投射系での Fmi の分布

R-axon が標的に向かって軸索を伸長させる 3 齢幼虫後期で、Fmi の発現パターンと細胞内分布を調べた (Fig. 3-14)。Fmi は、成虫の光受容細胞の細胞体と伸長中の軸索表面に分布していた。しかし、medulla 領域に到達した R7 および R8 の軸索の多くで Fmi の分布がみられなかった。そこで、medulla に到達してから時間が経過してから光受容細胞の軸索上に現れる抗原を認識する 24B10 との二重染色を試みたところ (Kunes et al., 1993)、共に陽性となる軸索はほとんど存在しなかった (Fig. 3-14)。すなわち、R7 および R8 の軸索では成長円錐が標的細胞に到達するまでは膜表面に Fmi が存在するが、その後積極的な輸送や分解によって排除されると考えられる。この分布変化は、Fmi が軸索の経路認識や標的認識に関与する一方、その後のシナプス形成過程などには寄与していないことを示唆している。

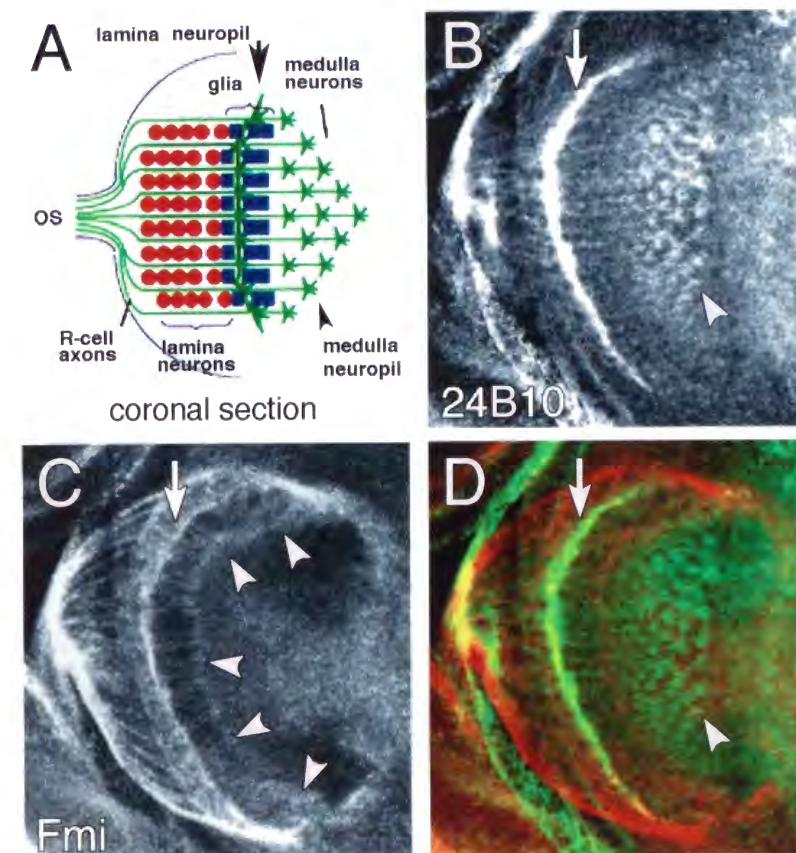


Fig. 3-14 3 齢幼虫後期での Fmi の分布パターン (A) lamina および medulla に投射する R-axon。(B) 成熟した光受容細胞の細胞表面を染め出す 24B10 (anti-Chaoptin 抗体) による染色像。光受容細胞のうち形態形成溝 (morphogenetic furrow) の後側 6 ないし 7 列のクラスターに属する細胞は 24B10 抗原を発現していない (Kunes et al., 1993)。(C) Fmi の分布パターン。新たに medulla に投射してきた後着の軸索にのみシグナルが認められる。ほかにも、この発生過程で medulla に移動していく medulla neuron にも分布がみられる。(D) 二重染色像。24B10 のパターンと Fmi のパターンとがほぼ相補的であることがわかる。



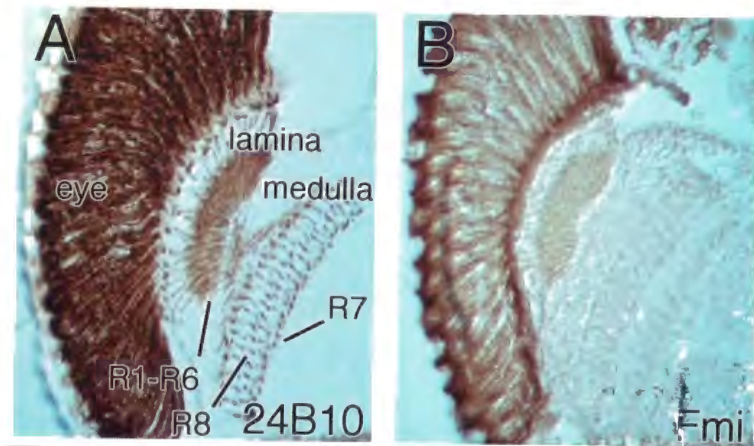


Fig. 3-15 成虫頭部での Fmi の分布  
(A) 24B10 の染色像。すべての視神経細胞の細胞体と軸索が染まっている。(B) Fmi の分布パターン。細胞体の頂部側と基部側にシグナルが認められるが、軸索上にはほとんどタンパクは分布していない。シナプスが多く存在する lamina や medulla 領域でわずかしが存在しない。

### fmi 変異体での R-axon 投射の異常

R-axon の走行パターン、特に経路認識や標的認識過程での Fmi の役割を明らかにするため、*fmi* を欠損した個体での解析を試みた。ただし、機能を完全に喪失したアレル (*fmi*<sup>F59</sup> など) のホモ接合体は胚発生後期に致死となるため、(1) 神経系に限定したトランスジーンの発現によるレスキュー成虫、(2) 体細胞組換えによる変異体クローンの作製 (Xu and Rubin, 1993) を利用して解析を進めた。

(1) *GAL4* 系統 *GAL4-1407* は、胚期から蛹期までを通じて広く神経系で *GAL4* を発現する一方、光受容細胞では発現していない。そのためレスキュー個体では、*fmi* を発現していない軸索が *fmi* を発現している視葉に投射することになる。このレスキュー個体において、medulla 領域に投射する軸索の一部が伸長の途上で停止していた。また、少数の軸索が medulla のより深層部にまで伸長することがあった。このことから軸索の伸長過程や標的認識過程に関与していることが予想できる (Fig. 3-16A, B)。一方、R1-R6 の軸索のみを標識できるマーカーを用いた解析から、lamina に投射する軸索がより深層にまで伸長することはなかった (Fig. 3-16C, D)。

レスキュー個体では、標的である視葉にも顕著な形態異常がみられた。つまり *fmi* は細胞集団の移動による脳構造の形成にも必要であると考えられ、R-axon の走行異常の一部は標的の構造異常による二次的な影響である可能性もある。

(2) ナンセンス変異 *fmi*<sup>F59</sup> のクローン由来の R7 および R8 の軸索は、medulla の表層部で伸長を停止したり、平行して隣り合っている軸索と誤って束形成をしたりする表現型を示した。確認はできないが、medulla 側にも同時に対応する位置で変異体クロー

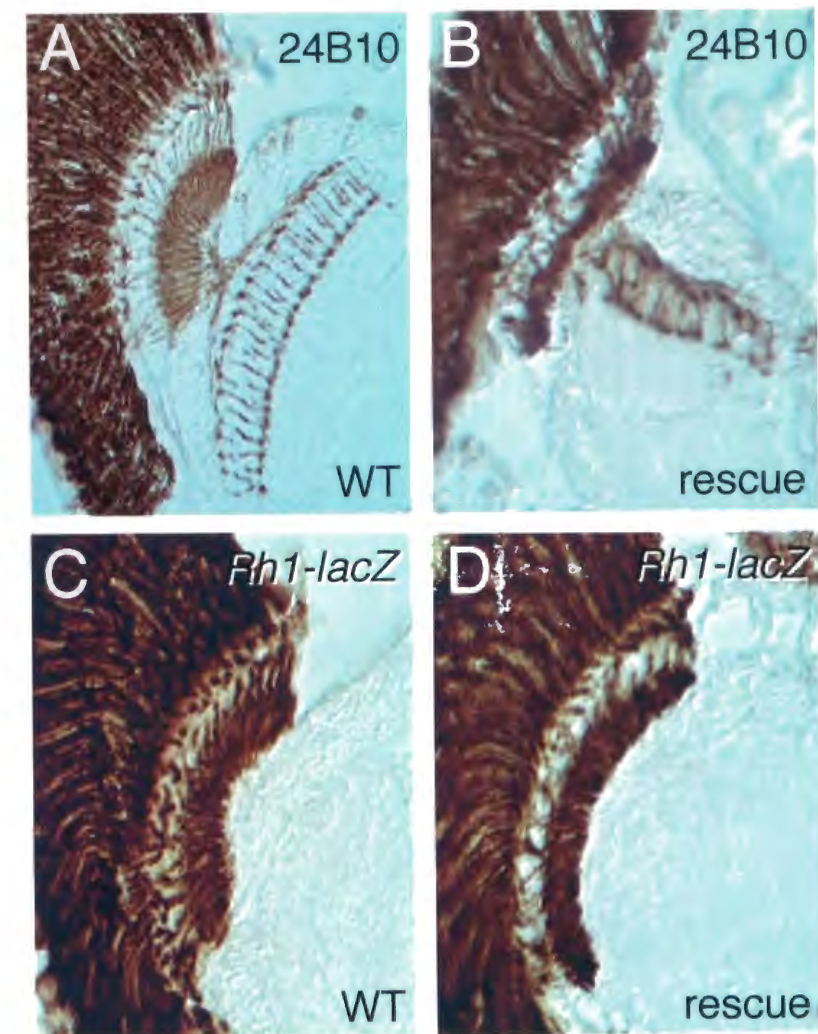


Fig. 3-16 *fmi* レスキュー個体での軸索投射パターン  
(A) 24B10 の染色像。すべての視神経細胞の細胞体と軸索が染まっている。(B) レスキュー個体での軸索の走行異常。medulla に投射していない軸索が多くある。また視葉の形態異常もみられる。(C) R1-R6 の軸索のみを染め出すマーカー (*Rh1-lacZ*) の染色像。(D) レスキュー個体では lamina の厚みがうすくなっている。これは軸索の投射異常の二次的な影響と考えられる。R1-R6 の軸索が lamina を通り過ぎて medulla まで走行するような異常は検出されなかった。

ンが形成されている可能性は低いと考えられる。したがって、Fmi は細胞自律的に機能し、軸索伸長や正しい束形成において必須の役割を担っていることが示唆される。さらに、lamina に投射する R1-R6 の終末部にも形態の異常がみられた。R-axon と lamina interneuron との間に形成される複雑なカートリッジ構造が正しく形成されていないらしい。Fmi は標的認識を終えた後でのシナプスの形成や成熟過程にも必要なのかもしれない (Meinertzhagen and O'Neil, 1991)。

### 過剰発現個体での軸索走行の乱れ

軸索伸長過程における Fmi の役割を別の角度から検討するため、*GAL4-UAS* 強制発現系を利用した過剰発現を試みた。一部の光受容細胞 (R-1, -3, -4, -6, -7) で特異的に発現させるために、*sevenless (sev)-GAL4* を用いた。過剰発現個体では、一部の R-axon が medulla 領域の深部にまで投射してしまうことがあった。この個体では、medulla に投射した後も軸索の膜上に過剰な Fmi タンパクが存在していることが考えられる。このタイミングのずれが異常な伸長の原因となったのかもしれない。あるいは一部の軸



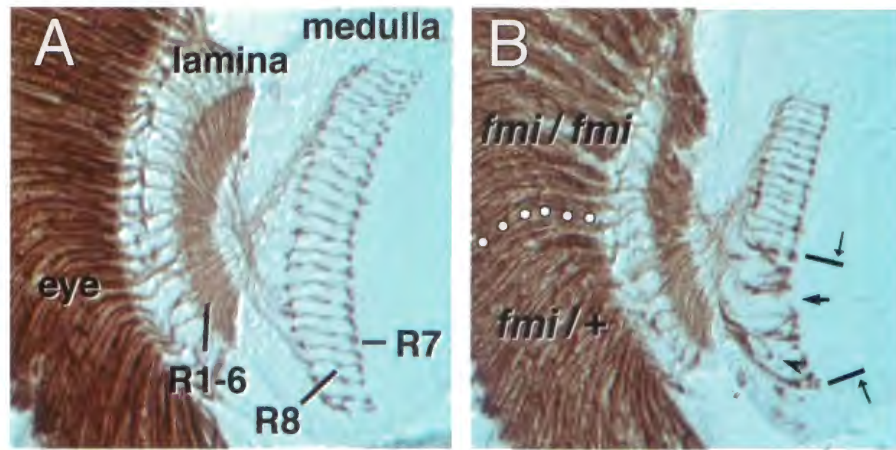


Fig. 3-17 *fmi* 変異体クローンでの軸索投射パターン  
(A) 24B10 の染色像。すべての視神経細胞の細胞体と軸索が染まっている。(B) *fmi* 変異体クローンを誘導した場合。*fmi* 活性を完全に欠く軸索は異常な投射パターンを示す。medulla 領域の小矢印で囲まれた領域が本来投射すべき範囲である。まったく投射して

いない (矢印) 軸索や、隣接する軸索と誤って束形成する (矢じり) 軸索が高頻度に観察できる。また、lamina に投射する軸索にも形態異常がみられる。一方 *fmi* ヘテロ接合の光受容細胞由来の軸索は正常に投射している。

索だけが過剰の Fmi を持つようになり、何らかのバランスを崩して、軸索束を形成する機構が破綻したのかもしれない。

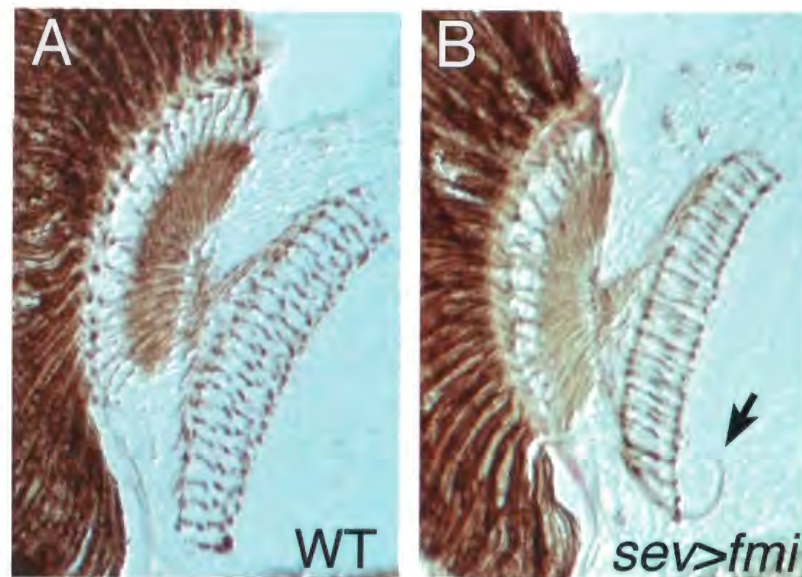


Fig. 3-18 *fmi* 過剰発現個体での軸索走行異常  
(A) 野生型の 24B10 染色像。(B) 眼特異的な *sevenless* の発現調節領域を利用して *fmi* を過剰発現させた。R-axon の一部が medulla の深層部にまで伸長することがあった。

#### 個眼の平面内細胞極性異常と R-axon の走行異常との関連

レスキュー個体では、個々の個眼の配列の極性が乱れ、また一部の個眼の鏡像性 (chirality) が逆転したり消失したりしている。このことから、軸索走行の異常が、主に細胞体の極性異常に起因するという可能性が残る。この可能性を検討するため、*fmi* と同様の極性異常を示す変異体 *frizzled* (*fz*) での R-axon の走行パターンを調べたところ、

*fz* ヌル変異体の R-axon は正常なパターンで投射していた (Meyerowitz and Kankel 1978; this study)。この結果からすくなくとも言えることは、いわゆる平面内細胞極性の異常は軸索走行の異常を誘発する要因として十分ではない、ということである。つまり、*fmi* は平面内細胞極性の形成に関与する一方、それとは独立した機構を介して軸索の走行パターンを制御していると想像できる。

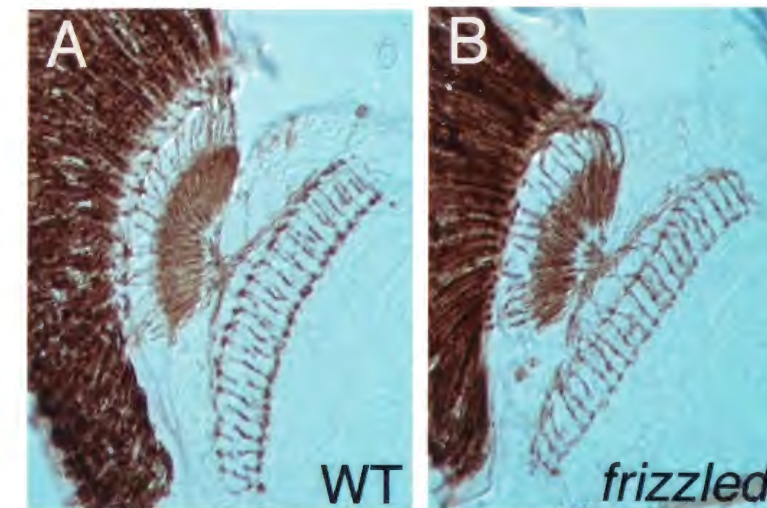


Fig. 3-19 *fz* 変異体では軸索は正常に投射する  
(A) 野生型の 24B10 染色像。(B) *frizzled* 変異体の 24B10 染色像。正常に投射しており、野生型とほとんど区別はつかない。



## 3-2. 考察

### 3-2-1. Fmi を介した軸索ガイダンス

軸索ガイダンスをつかさどる因子 (guidance cue) は機能的に 2 種類に分類できる。一つは instructive cue と呼ばれるもので、成長円錐に対して進行方向を積極的に“教える”という役割を持つ。もう一つは permissive cue と呼ばれ、成長円錐の guidance cue に対する感受性を制御している。いずれの cue も、その授受が阻害されるとガイダンスの異常をしめすが、逆に異所的に与えられたときには異なる反応がみられる。つまり、instructive cue を本来存在しない場所や時期に発現させると、成長円錐は誤った方向に移動してしまう。一方、permissive cue の場合には、成長円錐は必ずしも異常な振る舞いをするとは限らない。言い換えれば、周囲からの instructive cue に依存した異常を示す、ということになる。もちろん、ある一つの分子に注目した場合、それが機能的にどちらの cue に属するかは状況によって変わりうる。

胚の神経系では *fmi* が神経系で広く発現していること、過剰に発現させても顕著なガイダンス異常を示さないことから、後続ニューロンの軸索の伸長や適切な束形成に対して permissive cue として働いていると言えるだろう。胚の末梢神経系の異常からは、*fmi* が特定のニューロン由来の軸索でのみ必須の機能を持つことも示唆されている。一方、視神経投射系での解析からは、Fmi が積極的に成長円錐の進行方向の決定に関与することが示唆される。おそらく、instructive に機能する場合と permissive に働く場合とが、状況に応じて使い分けられているのではないだろうか。例えば、permissive cue としては Fmi 同士の間でのホモフィリックな相互作用が利用されており、一方で instructive cue の受容には未知のリガンド分子との相互作用を介している、という 2 つの独立した分子機構が存在するのかもしれない。このことは、Fmi の一部を欠失したような変異型分子の生体内での活性を検討していく必要があるだろう。

成長円錐の挙動とは、その細胞骨格系の再編成過程にほかならない。では、Fmi はどのようなメカニズムで細胞骨格系の状態を制御しているのだろうか。培養細胞のアッ

セイや *Xenopus* の脊髄神経を用いた解析などから、成長円錐の細胞骨格系の制御に cAMP や Ca イオンなどの二次メッセンジャーが関与するという報告がある (Gomez and Spitzer, 1999)。一方 Fmi の 7 回膜貫通領域と高い相同性を示すセクレチンレセプター (ラット) は、活性化すると細胞内の cAMP の濃度を上昇させることがわかっている (Ishihara et al., 1991)。このことから、例えば成長円錐の細胞膜上の一部で Fmi が活性化されると細胞内の cAMP 濃度が上昇し、その結果として細胞内骨格系が局所的に再編成され成長円錐の挙動につながる、という可能性もあるだろう。

### 3-2-2. Fmi と樹状突起形成

樹状突起のガイダンスは、軸索ガイダンスと同様のメカニズムにより制御されるのだろうか。軸索との相違点の一つは、一つの神経細胞から同時に複数本が出芽 (budding) し、かつそれぞれの突起が互いに異なる典型的な形態をとっている点である。このように複雑な構造物を正確につくりあげるうえで、効率的なメカニズムとはどのようなものだろうか。軸索と同様に、周囲から拡散性のシグナルや接触依存性のシグナルが与えられることも考えられる。しかし、むしろ内因性の情報に依存することで典型的な細胞形態をとることも可能であろう。たとえば、*fmi* 変異体での突起の背側への overgrowth は、周囲からの“ストップ”シグナルに応答できなくなったことが原因とも考えられるし、“ストップ”するタイミングを計る細胞自律的な機構が損傷したことによるとも考えられる。

Gao らは変異体スクリーンにより *fmi* の他にも *prosoero* (*pros*) や *kakapo* (*kak*) など既知の遺伝子ほか、多くの未同定の遺伝子が樹状突起のパターン形成に関与することを報告している (Prokop et al., 1998; Gao et al., 1999)。*pros* や *kak* のように軸索ガイダンスにも必須である因子と、軸索ガイダンス異常を示す変異体スクリーンで分離されていなかった因子とが共に同定されたことは興味深い。同じく Gao らは、多極性ニューロンの樹状突起の形態形成を、時間を追って観察している。その結果、一次突起の進展・二次突起の出芽・選択的な突起の退縮などが順序よく進行していることがわかってきた。こうした発生段階のどのステップで Fmi が機能しているかを突き止めること

が重要であろう。その上で、Fmi の役割とその他の因子との機能的な相互作用を検討することが、パターン形成メカニズムの理解につながると期待される (Shulman and Johnston, 1999)。

樹状突起形成と細胞内骨格系の動態制御との関連にも注目すべきである。マウスの小脳にあるプルキンエ細胞やショウジョウバエの末梢神経系での解析から、アクチン骨格系の制御に関与する Rac という低分子量 Gタンパクが、突起のパターンや spine などの微細構造の形成に重要であることが示されている (Luo et al., 1994; Luo et al., 1996)。Fmi と Rac などとの機能的な相互作用についても検討する意味があるだろう。

### 3-2-3. 神経細胞の極性と軸索ガイダンス

次章で述べるように、*fmi* は上皮組織の平面内細胞極性を制御している。神経系においても、少なくとも成虫の光受容細胞と感覚毛細胞については、その細胞体の極性を制御している (Lou et al., 1999)。軸索走行の異常を検討する上で、極性異常が軸索伸長に及ぼす影響を考慮する必要がある。たとえば、細胞体の極性が変化してしまい、組織に対しての軸索伸長方向が相対的にずれ、その後の伸長過程で異常が生じるといような間接的な影響もありうる。逆に、細胞体の極性は正常であっても、細胞体に対しての軸索伸長方向を決める極性決定機構が崩壊してしまうような、より直接的な影響もあるだろう。

しかし、*fz* ヌル変異体においては光受容細胞の軸索は正常に投射していた。細胞体の極性そのものは軸索走行パターン形成には本質的な影響を及ぼさないことを、この現象は意味している。いったんは誤った方向に伸長した軸索が、周囲の正常な組織からのシグナルに依存して正しい走行パターンを回復したのかもしれないし、軸索伸長方向は伸長開始時から正常であったのかもしれない。もちろん *fmi* 変異体と *fz* 変異体の示す極性異常には光学顕微鏡では検出できないような差があり、それが軸索走行異常の差に反映されているという可能性は否定できない。2 つの変異体の極性異常を電子顕微鏡レベルで再検討する必要がある。また、*fmi* 突然変異系統のなかには解析に

役立つような表現型を示すものがあるかもしれない。たとえば、軸索走行異常は示すが細胞体の極性異常は示さないような系統が見つければ、より明確に議論できるだろう。さらに実際に伸長が開始される三齢幼虫期において、各変異体の軸索走行を詳細に観察することが重要であろう。

神経系における細胞の極性形成については、ニューロブラストの頂部-基部軸形成を除いてほとんど明らかになっていない。胚の神経系においても、細胞体の極性異常が軸索走行異常の原因となりうるかどうかについては、より詳細な解析が必要であろう。今後の研究により、その一端が明らかになると期待したい。

## 第 4 章



## 第4章. 平面内細胞極性の形成における役割の追究

### 4-0. はじめに

上皮組織は一層の細胞層からなるシート状の組織である。個々の細胞には頂部 - 基部の極性があり、細胞骨格系の配置、物質の輸送経路、あるいは細胞膜成分などさまざまな非対称性を持つことが知られている。一方、頂部 - 基部の極性とは直交する平面方向にも一定の極性が存在しており、平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) もしくは組織極性 (tissue polarity) と呼ばれている (Eaton, 1997)。例えば、哺乳類の内耳の蝸牛管にある有毛細胞 (hair cell) は、不動線毛 (stereocilia) と呼ばれる繊毛を頂部側に形成するが、それらは一定の方向に並んでいる。さらに、隣り合う有毛細胞同士では互いの不動線毛の配向が一致していることが知られている。また、ショウジョウバエにも、翅表面に形成される翅毛 (wing hair)、体表面に分布する感覚毛 (bristle)、複眼を構成する光受容細胞のクラスターなどは一定の配向性を持っている (Adler, 1992; Gubb, 1998; Shulman et al., 1998)。

このように生物種を問わず広くみられる現象であるが、平面内細胞極性の形成機構の解析は、現在までのところショウジョウバエを用いた遺伝学的な解析によって進められてきた。特に、単一の細胞種からなる組織である翅上皮の極性に関する解析から、いくつかの因子が相互作用する複雑なシステムにより制御されていることが、徐々に明らかになってきた (Gubb and Garcia-Bellido, 1982; Eaton et al., 1996; Turner and Adler, 1998)。

その中でも重要であると考えられる因子が、7回膜貫通型レセプター Frizzled (Fz) である。*frizzled* (*fz*) は感覚毛の極性異常を示す突然変異体として分離され、光受容細胞のクラスターや翅毛の極性も乱れる。遺伝学的な相互作用の解析から、現在のところ最も上流に近い因子であると考えられている (Park et al., 1994a; Park et al., 1994b)。また、相同分子である D-Frizzled2 が Wg のレセプターとして機能することから、Fz も未知の Wnt ファミリー分子をリガンドに持つ可能性があると予想されている (Vinson et al., 1989; Bhanot et al., 1996)。生化学的な検証はないものの、Fz は活性化されると下

流で2つの独立したシグナルカスケードを動員するというモデルが立てられている。その一つは *dishevelled* (*dsh*) を介した細胞自律的な経路である。Dsh は Wg シグナリングにも関与するが、その下流因子は Wg シグナリングのそれとはまったく異なっているらしい (Perrimon and Mahowald, 1987; Axelrod et al., 1998; Boutros et al., 1998; Shulman et al., 1998)。Fz や Dsh はprehair (形成初期の wing hair) を、細胞の遠位側の辺縁部に限定して形成するのに必要であると考えられている (Wong and Adler, 1993; Krasnow et al., 1995)。

一方、*lz* のモザイク解析から Fz は細胞非自律的に作用することがわかってきた。*lz* 変異体細胞自身だけでなく、遠位側で隣接している野生型細胞までもが極性異常を示す (Vinson, 1987)。この現象から、極性化シグナルである Fz のリガンドが近位側の細胞から遠位側の細胞へと伝播していくという仮説が提唱されている (Adler, 1997)。

他にも *prickle* (*pk*)、*strabismus*/*Van Gogh* (*strbm*/*Vang*) など、同様の表現型を示す変異体についての解析が進められてきたが、分子や細胞のレベルでの詳細な検討は不十分であった (Gubb et al., 1999; Wolff and Rubin, 1998; Taylor et al., 1998)。つまり、それぞれの遺伝子がコードしているタンパクが細胞内でどのように分布し相互作用するのか、さらにそれらがどんなメカニズムで細胞内骨格系を制御するのかという視点から検証されたことはほとんどなかった。

*flamingo* は胚の表皮や後腸上皮で発現するほか、蛹期の翅上皮でも発現が見られる。Fmi タンパクは上皮細胞内の特定のコンパートメントに偏って分布し、そのパターンは Fz の活性により制御されている。また *fmi* 変異体および過剰発現個体の表現型解析から、Fmi と Fz とが互いの活性を負に制御し合うことで翅毛の極性を調節していることが明らかになってきた。

## 4-1. 結果

### 4-1-1. *fmi* は平面内細胞極性を制御している

*fmi* ヌル変異体のレスキュー個体および機能低下型変異体は、体表の平面内細胞極性の異常を示した (Fig. 4-1 C; Lu et al., 1999)。ヌル変異体の表現型を回復させる際には、*fmi* cDNA が主に神経系で強制発現されており、一方表皮細胞と眼原基の光受容細胞においてはほとんど発現していない。従って、レスキュー個体の表皮細胞は *fmi* 活性を失った状態にある。翅表面の翅毛は、本来は近位 - 遠位軸方向 (翅の根元から先端に向かう方向) に整列している。しかし、*fmi* レスキュー個体では前側 (頭側) もしくは後側 (尾側) に傾斜してしまう。こうした異常は他の変異体で観察される異常によく似ており、*fmi* が翅毛の極性形成に必須の役割をはたしていることを示している。

翅毛の極性異常は、体細胞組換えによるモザイク解析でも確認できた。ヌル変異 E59 のヘテロ個体において *Flp-FRT* による変異体細胞のタローンを形成したところ、クローン内の翅毛がレスキュー個体と同様の極性異常を示した (Fig. 4-1 D)。また、翅毛が形成される蛹化後 30 時間ごろの表皮細胞を観察したところ、翅毛の形成される位置に異常が見られた。正常な翅毛は、細胞の頂部表面の遠位側辺縁部にアクチン繊維が集合することで形成が始まる。一方、変異体では細胞表面の中央部に形成されたり、辺縁部でも前側や後側で形成されることが高頻度に観察された。

### 4-1-2. Fmi は翅表皮細胞の P/D 境界面に分布している

翅毛は蛹形成開始後 (after puparium formation, APF) 30 ~ 36 時間に形成される。翅毛の極性形成過程における Fmi の役割を調べるために、まず表皮細胞における Fmi タンパクの挙動を追跡した (Fig. 4-2)。APF 30 時間の翅では、表皮細胞間の接触面のうち、近位側と遠位側の隣接細胞との接触面 (P/D 境界面) に Fmi タンパクの濃縮がみられるのに対し (Fig. 4-2 C)、前側と後側の隣接細胞との接触面 (A/P 境界面) にはほとんど分布していなかった。この際立った分布パターンが極性形成と何らかの関連を持つことが予想されたので、発生段階を追ってタンパクの分布を検討した。三齢幼虫後期の翅原基では、Fmi はすべての細胞境界に一様に分布しているようであった。また APF 18

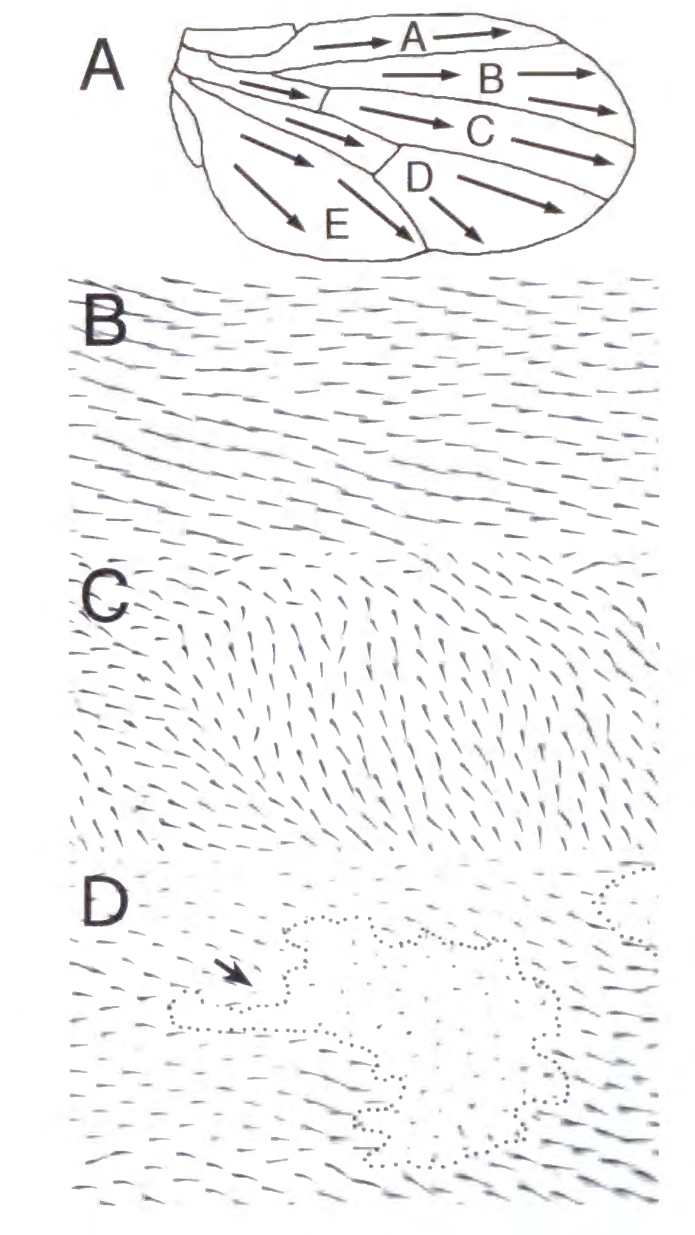


Fig. 4-1 *fmi* 突然変異体では翅毛の極性が変化する

(A) 成虫の翅を、支脈を指標にして区分した領域 [A-E] を示す。矢印は、野生型でのそれぞれの領域における翅毛の向きを示している (Wong and Adler, 1993)。(B, C) 野生型 (B) および *fmi* ヌル変異体 (成虫にまで生育したレスキュー個体) の領域 D における翅毛のパターン。 *fmi* ヌル変異体では、大半の翅毛が後方に向いてしまっている。(D) *fmi*<sup>ES9</sup> のモザイククローン。翅毛の形態マーカーである *pawn* (*pwn*) で標識されており、黒点線で囲んだ。翅毛極性に関するかぎり、細胞自律的に機能していることがわかる。一方、矢印で示すように、クローンに隣接する細胞には低頻度に翅毛が 2 本生えることがある。調べた 104 クローンの内 4 クローンでのみ 1 - 3 つの細胞で複数の翅毛がみられた。

時間の翅でも同様で、とくに不均一な分布は観察されなかった (Fig. 4-2 A)。ところが、APF 24 時間になると一部の細胞で、Fmi が P/D 境界面へ偏って分布し始めるのが確認できた (Fig. 4-2 B)。いったん不均一な分布パターンをとった後、APF 36 時間では Fmi タンパクは再びすべての細胞境界に一様に分布した (Fig. 4-2 E)。すなわち、Fmi 分子は基本的にすべての細胞境界に分布しているが、翅毛が形成される時期に限って一時的に P/D 境界面に濃縮する。

また三齢幼虫後期から蛹形成期にかけて、表皮での Fmi タンパクは常にドット状の



シグナルとして検出される (Fig. 4-2 A-E)。これは、細胞表面やあるいは細胞質内の小胞上で巨大なタンパク複合体を形成していることを示唆するのかもしれない。

#### 4-1-3. Fmi は細胞境界面の両側に分布している

Fmi タンパクが P/D 境界に濃縮している時、境界を挟む両側の細胞膜上に Fmi が分布しているのか、あるいは主にどちらか一方（例えば境界の近位側）にのみ分布しているのだろうか。この違いを見極めるため、体細胞組換えを誘導してヌル変異体細胞のクローンを作製した。野生型細胞と変異体細胞の接する境界面での Fmi の分布パターンから推測できると考えたからである。その結果、変異体細胞の膜表面に Fmi が検出されないだけでなく、変異体細胞と野生型細胞との境界面のすべてにおいて Fmi のシグナルがまったく見られなくなっていた。Fmi が、in vitro でのホモフィリックな相互作用活性を in vivo でも持ちうると思えば、この現象をうまく説明できるだろう。

つまり、細胞境界の両側に Fmi が分布してホモフィリックに結合しており、どちらか一方が膜上に存在しない場合には、向かい合った側の膜上には Fmi は安定に存在できなくなると考えられる。

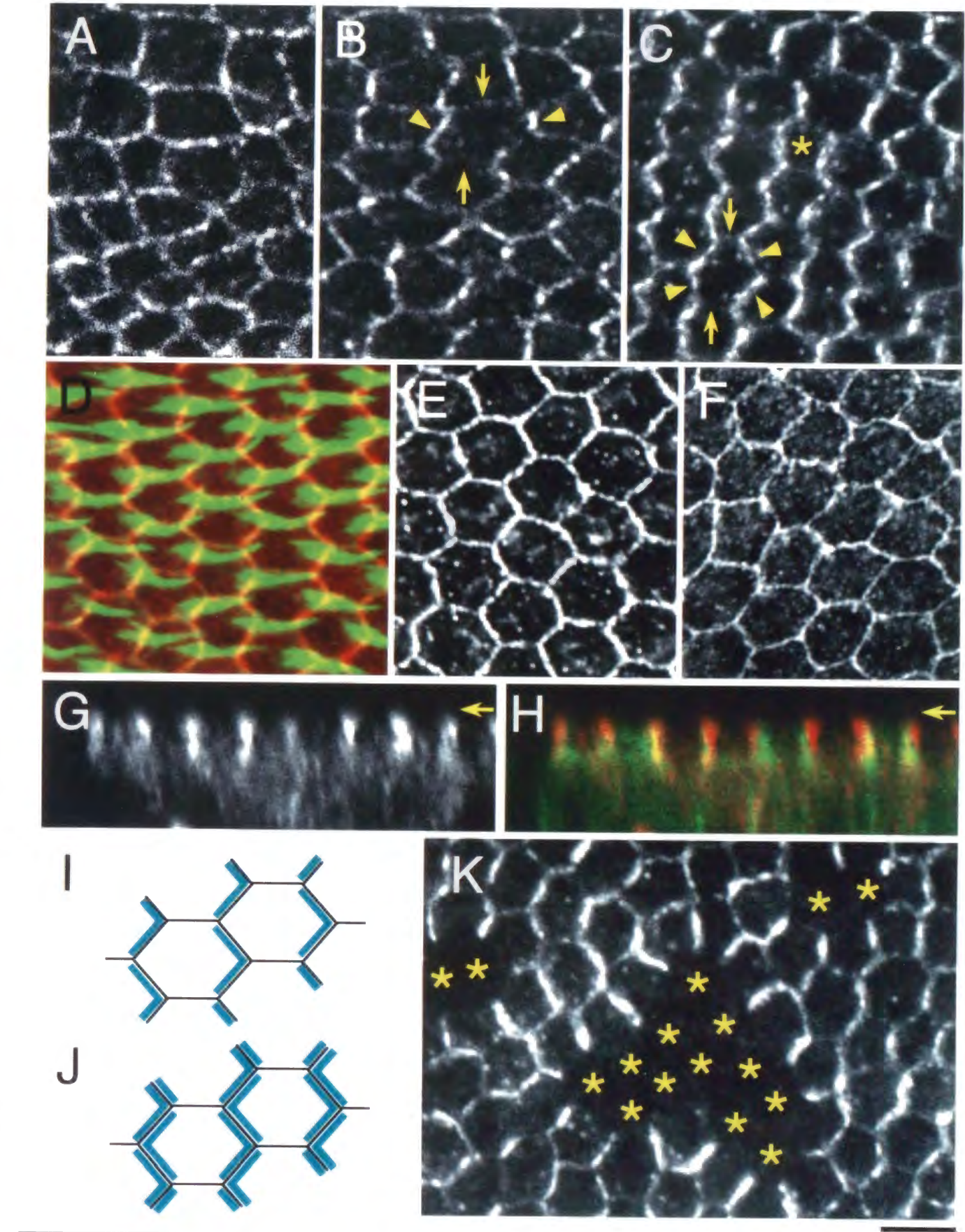


Fig. 4-2 Fmi の細胞内での分布パターンは一時的に極性化する

prehair の形成前もしくは形成中における Fmi の分布パターンを、抗体染色法により検討した。すべての写真で右側が遠位側、上側が前側である。(A) 蛹形成後 18 時間の翅での Fmi の分布パターン。特定の細胞間境界に濃縮しているようには見えない。(B) 蛹形成後 24 時間の翅での Fmi の分布パターン。P/D 境界でのシグナルのほうが僅かに強く、タンパクの分布が偏り始めているのがわかる。(C) 蛹形成後 30 時間の翅での Fmi の分布パターン。Fmi が P/D 境界に濃縮しており、A/P 境界にはほとんど分布していないことがわかる。(D) 同じく蛹形成後 30 時間の翅での Fmi の分布パターンと、ファロイジンによる F - アクチンの分布パターン。上皮細胞の遠位側の辺縁部から、アクチン繊維に富む一本の prehair が伸長しているのがわかる。(E) 蛹形成後 36 時間の翅での Fmi の分布パターン。Fmi がすべての細胞間境界にほぼ均等に再分配されている様子がわかる。(F) 蛹形成後 30 時間の翅での DE- カドヘリン の分布パターン。細胞の接着構造自体はすべての細胞境界で均一に形成されている。(G) 蛹形成後 30 時間の翅の垂直方向の断面像。Fmi の頂部-基部方向の分布パターンを示している。細胞境界の頂部側に濃縮しているのがわかる。(H) 同じく DE - カドヘリン (green) と Fmi (red) との二重染色像。矢印は頂部側の細胞表面を指している。(I and J) 蛹形成後 30 時間の翅での Fmi の分布パターンに対する 2 通りの説明。図の単純化のため、Fmi タンパクは細胞膜の裏打ちをしているかのように描いてある。(K) *fmi<sup>ts9</sup>* 変異体細胞を星印で示した。*fmi* 発現細胞と非発現細胞との細胞間境界には Fmi タンパクはまったく濃縮していない。



#### 4-1-4. Fmi の細胞内分布の制御メカニズム

さて、このような極性を持った Fmi の分布は細胞の極性形成においてどのような意味をもつのだろうか。そこでまず、これまでに分離されているいくつかの PCP 変異体における Fmi の分布を検討してみた。*frizzled (fz)*、*dishevelled (dsh)*、*prickle (pk)*、*inturned (in)*、*fuzzy (fy)*、および *multipl wing hairs (mwh)* の各変異体の蛹の翅での Fmi の分布パターンを調べた (Fig. 4-3)。その結果、*fz*、*dsh*、および *pk* では翅毛形成期になっても Fmi の偏ったパターンは見られなくなる一方、細胞質中に見られるドット状のシグナルの数が増加していた。また、*in*、*fy*、および *mwh* においては、野生型と同様の分布を示していた。このことから、少なくとも Fmi の偏った分布パターンは *fz*、*dsh*、および *pk* によって積極的に制御されていることがわかる。また、*in*、*fy*、および *mwh* は Fmi の下流で機能しているか、あるいは全く平行な経路で細胞の極性を支配しているのだろう。

#### 4-1-5. Fz 活性の差が Fmi の分布パターンを決める (1)

次に、*fz* が Fmi の分布を決定するメカニズムについての検討をすすめた。これまでの研究から、Fz の活性は一枚の翅の遠近軸に沿っては均一でないことが示唆されていた。例えば、(a) 個々の細胞の遠位側でより Fz 活性が高い、(b) より近位側にある細胞のほうが、より高い Fz 活性をもつ、などの可能性が考えられる。いずれの可能性においても、細胞の P/D 境界面をはさんで近位側で (つまり近位側の細胞の遠位側の辺縁部で) より Fz 活性が高いと考えられる。

そこで Fmi の分布パターンが P/D 境界を挟んだ Fz 活性の差に基づいて決定されるという仮説をたて、検証することにした。異なる Fz 活性を持つ細胞同士を隣り合わせるためのアプローチとしては、(1) 体細胞組換えにより *fz* ヌル変異体細胞を作製する (Fig. 4-4 A; Xu and Rubin, 1993)、(2) Fz を勾配状に強制発現させる (Fig. 4-4 B)、ことを利用した。

*fz* ヌル変異体細胞を作製し Fmi の分布を調べたところ、変異体細胞は隣り合う細胞に依存した Fmi の細胞内分布パターンを示した (Fig. 4-5)。変異体細胞クローンの最も外側の細胞では、野生型細胞と *fz* 変異体細胞とが隣接している。この隣接部分での境

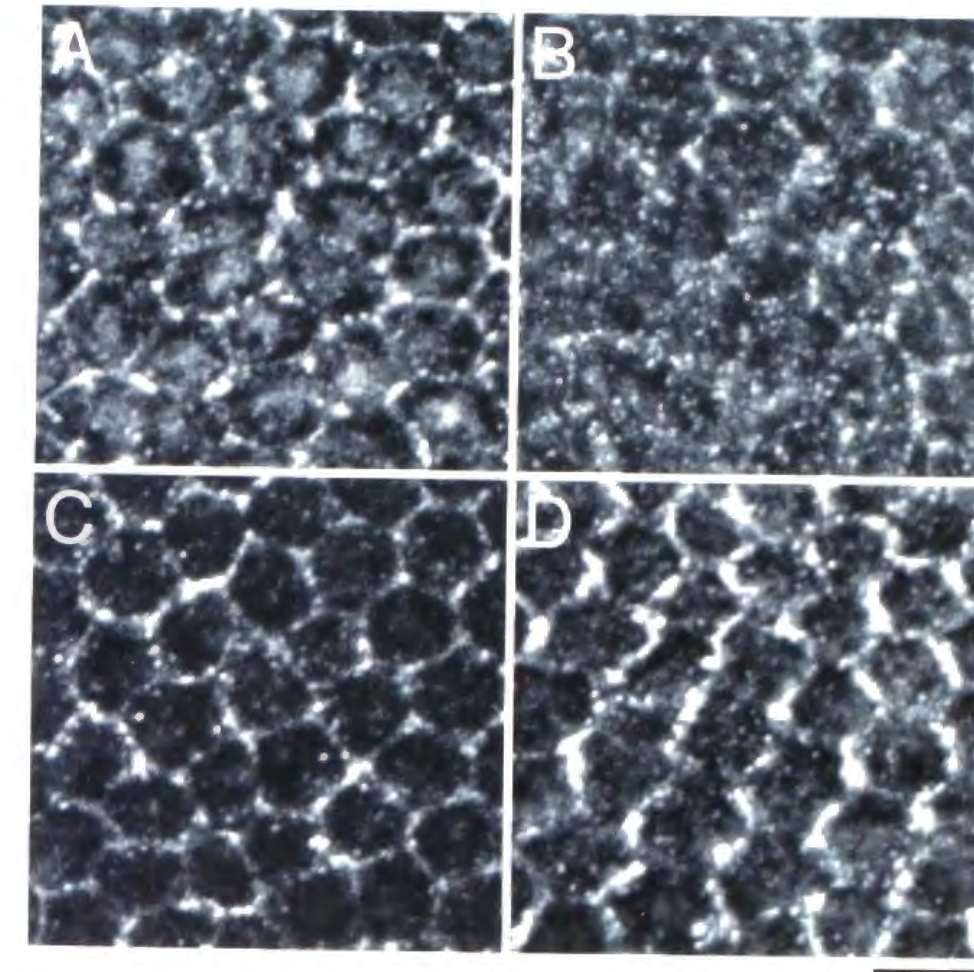


Fig. 4-3 PCP 異常を示す変異体での Fmi の細胞内分布  
各変異体の蛹の翅での Fmi の細胞内分布。(A and B) *fz* ヌル変異体(*fz<sup>K21</sup>/fz<sup>D21</sup>*)、(C) *dsh<sup>1</sup>*、(D) *mwh<sup>1</sup>*。(A, C, D) は蛹形成後 30 時間、(B) は蛹形成後 36 時間。(A and B) 細胞境界のシグナルが減少しており、P/D 境界への濃縮も見られなくなっている。一方細胞質に見られるシグナルが、野生型に比べて強くなっている。(C) *dsh<sup>1</sup>* 変異体でも同様な分布変化が認められる。(D) *mwh<sup>1</sup>* では、Fmi のジグザグパターンが保存されている。すべての像について、右が遠位側、上が前側である。

界では、そのほとんどで Fmi の濃縮が観察された (Fig. 4-5 B)。この分布は、P/D 境界である場合にもない場合にも見られる現象であった。一方、変異体細胞クローンの最も外側の細胞でも野生型細胞と隣接していない細胞境界には Fmi はまったく分布しなかった (Fig. 4-5 B)。よりクローンの内側の細胞群については、変異体細胞クローンの最も外側の細胞との境界部を除いて、基本的に *fz* ヌル変異体の場合と同様の分布パターンを示した。

ここで、クローンの外側で見られる Fmi パターンの変化に注目しておく。*fz* ヌル変異体のクローンをつくると、クローン内の翅毛が極性異常を示すだけでなく、クローンの外にある細胞の翅毛も極性異常を示す (Jones et al., 1996)。このような細胞非自律



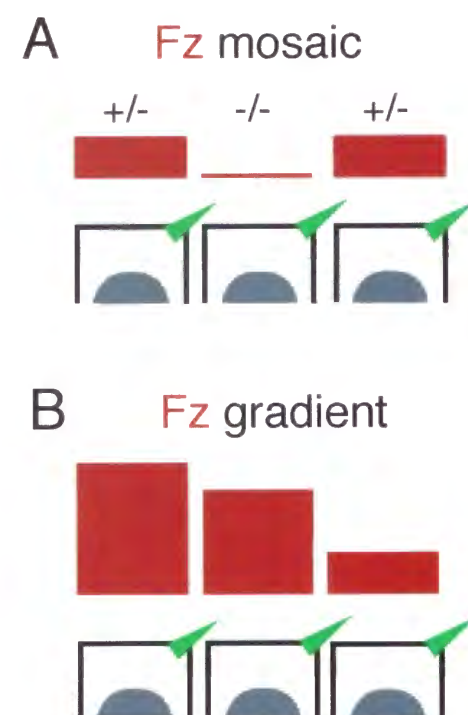


Fig. 4-4 Fz 活性をつくるための2つのアプローチ  
(A) *fz* モザイククロンの作製。変異体細胞と野生型細胞との境界面では、異なる Fz 活性を持った細胞が隣接することになる。(B) *fz* 勾配発現の誘導。GAL4-UAS 系を使って、*fz* を A-P 軸方向の勾配をもって発現させれば隣接する細胞間での Fz 活性の差を誘発できる。

的な異常は必ずクロンの遠位側に位置する細胞でみられ、クロンの近位側では観察されない。クロン周辺にある野生型細胞での Fmi の細胞内分布を観察したところ、クロンの遠位側の細胞では本来見られる Fmi のジグザグパターンが傾いたり、時には遠近軸と並行になったりする異常が高い頻度で観察された (Fig. 4-5 C, E)。一方、クロンの近位側の細胞ではそのような異常はほとんど見られなかった (Fig. 4-5 D)。ここでの Fmi の分布異常が、実際に翅毛の極性異常と一致しているかどうかは確かめられないが、頻度の高さから見ても強い関連性があると思われる。

#### 4-1-6. Fz 活性の差が Fmi の分布パターンを決める (2)

次に GAL4-UAS システムを利用して *fz* を強制発現させて異なる *fz* 発現量の細胞同士が隣接するようにしてやり、Fmi の分布にどのような影響を与えるか観察した。GAL4 系統としては *ptc-GAL4* を利用した (Rodriguez and Basler, 1997)。この系統では、翅の領域 C 内で Fig. 4-6 A のように A-P 方向の勾配をもって発現させることができ、*fz* を発現させることにより発現量の高い方から低い方へと翅毛の極性が変化することがわかっている (Fig. 4-6 B, C)。*fz* の勾配発現下では、Fmi の P/D 境界での濃縮はみられなくなり、シグナルの大半は A/P 境界にみられるようになった (Fig. 4-6 E, F)。このことから少なくともこの実験条件下では、隣り合う細胞間での Fz のレベルの差が Fmi の濃縮させるのに十分であるということを示している。

*fz* の過剰発現による表現型は、シグナルの下流因子であると考えられている *dsh* の機能喪失変異により抑制されることがわかっている。つまり、*fz* の過剰発現によって Fz の活性が上昇していると考えられる。

勾配発現による実験の結果とモザイク解析による実験の結果とを考え合わせれば、次の2つの結論を提示できるだろう。(1) 翅の上皮細胞は、隣り合う細胞同士の間でコミュニケーションすることにより、一つ一つの細胞境界について、互いが持っている Fz 活性のレベルを比較することができる。(2) Fmi が細胞境界に濃縮していることが、隣り合う細胞間で Fz 活性に差があることの証拠となる。

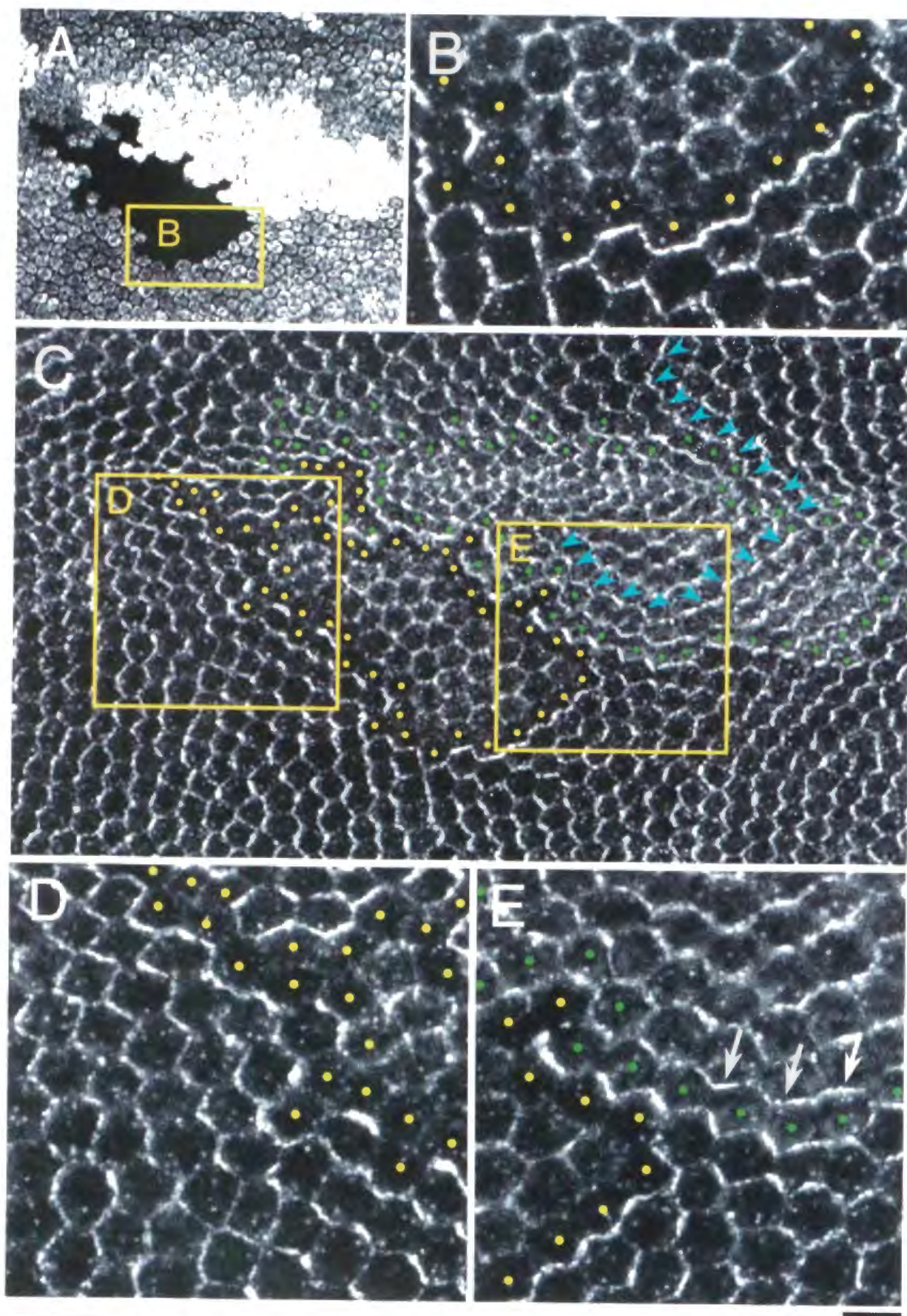
#### 4-1-7. *fmi* の勾配発現による翅毛極性の変化は *fz* の場合の逆である

ここまでの結果から翅毛の極性形成に関して推定できることをまとめると、(1)

##### Fig. 4-5 *fz* クロンの内部、境界部、および周辺部での Fmi 分布パターンの変化

*Flp-FRT* システムにより、ヌル変異体 *fz<sup>Δ52</sup>* の変異体細胞を作製した。すべての像について右が遠位側、上が前側である。蛹形成後 30 時間の翅を、(A) ではモザイククロンの検出のためマーカーの N-Myc を染色し、(B-E) では Fmi を視覚化した。(A) N-Myc のシグナルがない領域が *fz<sup>Δ52</sup>* 変異体細胞である。明るく光っている細胞は野生型の細胞 (+/+) である。(B) (A) で示した領域での Fmi の分布を拡大した像。最も外側の変異体細胞 (黄色のドットでしめした) と野生型細胞との境界面すべてに Fmi の分布が見られる。一方、最も外側に位置する変異体細胞同士の細胞間境界には、Fmi のシグナルは認められない。(C) クロンの全体を含む視野。変異体細胞を黄色のドットで、野生型 (+/+) 細胞を緑のドットで示した。クロンの遠位側の Fmi のジグザグパターンは P-D 軸に対して傾いている傾向がある (青矢じりの列)。(D and E) (C) でボックスで囲んだ領域の拡大像。クロンの近位側では、Fmi は P/D 境界面に濃縮しているが (D)、クロンの遠位側では多くの細胞の A/P 境界面に Fmi が濃縮している (E)。ここでは野生型細胞のクロンが遠位側にあるものを示したが、逆に近位側に位置する場合でも同様のパターン異常がみられた。





P/D 方向の細胞間境界を挟んで近位側にある細胞の遠位側の縁で、より Fz の活性が高く、(2) Fz 活性に差がある境界面には、翅毛形成期に Fmi が強く濃縮し、(3) 境界の両側に均等に分布している Fmi が、翅毛形成にとって重要な役割を果たしているということである。しかし、P/D 方向に均等に分布している分子が、P/D 方向に非対

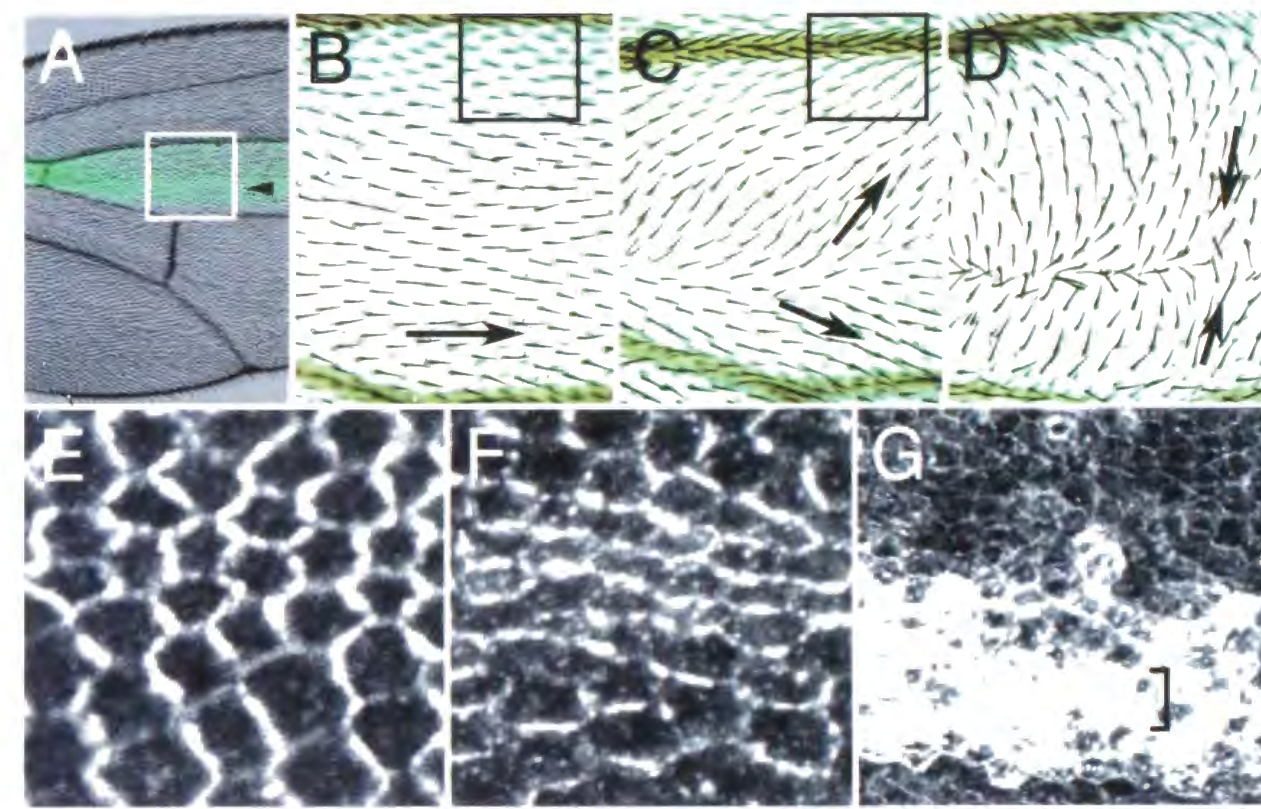


Fig. 4-6 *fz* および *fmi* の勾配発現実験

(A) *ptc*-GAL4 による勾配発現系。GFP を発現させたもので、領域 C において A-P 軸方向の濃度勾配を形成しているのがわかる。勾配の最高点と思われる位置を矢じりで示した。(B) では細胞外領域を欠く Fmi 分子 ( $\Delta$ EX) を、(C and F) では Fz を、(D and G) では Fmi 全長分子を、そして (E) では GFP を発現させた。(B-D and G) は (A) でボックスで示した領域の拡大像になっている。また (B-D) では翅毛の向きを矢印で示した。(B) DEX の勾配発現は翅毛の向きに影響を与えなかった。(C and D) *fz* の発現量のピークから遠ざかる向きに翅毛の向きが変化する (C) のに対し、Fmi 勾配の高いほうに向けて翅毛の向きが変化した (D)。(G) は Fmi 勾配を、抗体染色により視覚化した。(E and F) (B) および (C) でボックスに囲んだ領域での、蛹形成後 30 時間の Fmi の分布パターン。(E) GFP の勾配発現は Fmi の分布に影響しないが、Fz の勾配発現では A/P 細胞境界面に Fmi が濃縮してしまう。やや小さく見える細胞は支脈になる細胞である。すべての像について、右側が遠位側、上が前側。

称な構造である翅毛形成を制御できるのだろうか。この問題を検討するためには Fmi 自身の活性についての理解が必要である。そこでまず、Fmi の活性が P/D 境界を挟ん



で何らかの差を持っているのではないかと想定した。この仮説を検討するため、*fz* の場合と同様に A/P 方向の勾配をもって強制発現させて、翅毛極性に現れる影響を調べた。すると *fz* の勾配発現の場合とは逆に、*fmi* 発現量の低い方から高い方へと翅毛の向きが変化した (Fig. 4-6 D)。この結果から、「翅の上皮細胞では P/D 境界を挟んで Fmi の活性に差があり、遠位側の細胞の近位側の縁でより Fmi 活性が高くなっている。そして、*fz* とは逆に、より Fmi 活性の低い縁で翅毛が形成される。」という仮説を立てることができる。

この仮説を考えるうえで、いくつか検討すべき問題点がある。ひとつは過剰発現による効果が、実際に Fmi 活性の上昇によっているのかどうかという点である。さらに、*fmi* を勾配発現させたとき、Fmi が細胞膜以外の恐らく細胞内膜系にも多量に存在している点である。Fmi が細胞膜上に存在しなくても活性化状態をとりうるのだろうか。前者を吟味するには *dsh* などの下流因子との遺伝学的相互作用を検討する必要があるだろう。また後者の可能性は、活性化している Fmi を特異的に標識できるプローブによる検討が必要になる。

4-1-8. *fmi* の優性表現型の多様性

*fmi* の完全機能喪失型変異体が示す致死性や PCP 異常は、いずれも劣性表現型である。しかし、E86 を含む 5 つのアレルは、優性の翅毛極性異常を示した。興味深いことに、C' 領域と呼ばれる翅の特定の領域にのみ、典型的な“逆向き”の極性異常がみられる (Fig. 4-7 C-H)。また、アレルごとに異常の程度に違いが見られた。例えば、E86 では翅の両面に異常があるのに、E41 は腹面にのみ比較的穏やかな極性異常を示す。他の PCP 変異体についても、*Van Gogh (Vang)* や *prickle (pk)* には優性表現型をしめすアレルの存在が知られており、なぜか同様に C' 領域に限定された異常が観察される。

ホモ接合体胚の抗体染色の結果から、優性変異体はいずれも、少なくとも細胞外領域を持つ Fmi タンパクを産生しており、野生型と同様にニューロパイル上に分布している。また、ヌルアレル E59 と野生型アレルとのヘテロ接合はこうした極性異常を全

く示さない。つまり、この異常は単に遺伝子のコピー数の半減による表現型（ハプロインサフィシェンシー）ではない。一方、E86 は劣性の半致死性で少数の成虫が出現する。この E86 ホモ成虫の翅毛はヌル変異体と同様の異常を示すが、C' 領域に見られる“逆向き”の極性異常は示さない。以上の観察から、これらのアレルでは変異型 Fmi 分子が存在しており、それがドミナントネガティブ的な機構で、正常な Fmi 分子の機能を変化させていると考えられる。これらのアレルについて、それぞれの変異部位を同定し、変異型分子の生化学的な性質を検討していくことで、Fmi の PCP 形成における役割をより深く理解できることになるだろう。

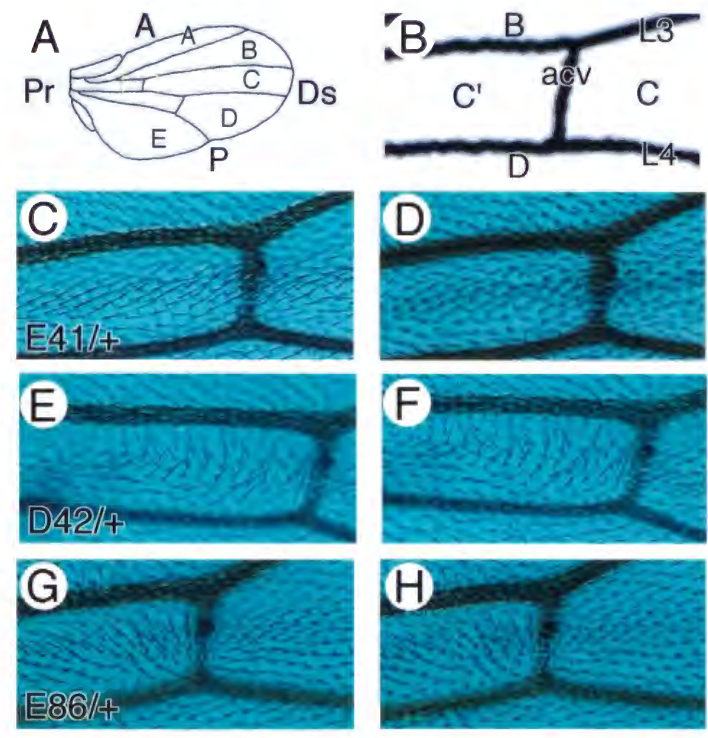


Fig. 4-7 優性変異が示す多様な表現型  
(A and B) 翅と翅上の各領域の模式図。(B) は (A) で囲んだ領域。(C-H) は各優性変異体のヘテロ接合体の翅毛の向きの異常を示している。左の列が背側表面、右が腹側表面の像である。(E) D42 や (G) E86 では翅毛が逆向きになっているのがわかる。一方、(C) ではほぼ性状だが、その腹側の (D) では若干の異常が認められる。ヌル変異である E59 のヘテロ接合体では、こうした異常は検出されない。



## 4-2. 考察

### 4-2-1. Fmi の細胞内分布は細胞極性を予示している

Fz を除けば、PCP 遺伝子がコードするタンパクの細胞内分布に関する報告は皆無である。本研究から、Fmi が prehair 形成期において、蛹の翅の上皮細胞の P/D 境界面に濃縮することが明らかになった。またホモフィリックな結合能をもつこととモザイク解析の結果から、P/D 境界面の両側に存在することが示唆される。

Fz の機能を阻害したり実験的に操作すると、必ず Fmi の細胞内分布が変化し、翅毛の極性変化とよく一致した。例えば、*fz* や *dsh* 変異体の翅では Fmi は膜への濃縮量が低下すると共に極性を持たない分布パターンをとる。また、A/P 軸方向に翅毛が向く場合には、Fmi が細胞の A/P 境界面に濃縮した。*fmi* 変異体が翅毛極性の異常を示すことを考え合わせると、Fz 活性が Fmi の P/D 境界面への濃縮に必須であり、さらに Fmi の正常な分布が prehair の形成される位置の正しい選択に重要である、ということがいえるだろう。翅毛形成期より以前に起こっている現象が観察可能になる可能性があり、PCP の機構を解明するうえでの強力な手段として利用できると思われる。

### 4-2-2. Fz が Fmi の偏った分布を制御する

P/D 境界への Fmi の濃縮を説明する機構は、A/P 境界から P/D 境界への積極的な輸送によるものと、A/P 境界と P/D 境界それぞれにおける安定性を変化させるものと考えられる。*Xenopus* 初期胚の上皮細胞を用いた実験から、細胞内因子 Dsh は細胞中の小胞状の分布をするが、Fz 依存的に細胞膜上に局在するようになることがわかっている (Axelrod et al., 1998)。*dsh* 変異体で Fmi の細胞膜上への濃縮が低下することから、Fmi の分布を制御する機構は Dsh と Fmi との直接的もしくは間接的な相互作用を介していると想像される。いずれにせよ、こうした Fmi の挙動は APF 18 hr から始まっている。この時間経過は、温度感受性変異体を用いた実験から予測されるように、Fz の活性が APF 15 hr 以降から prehair の形成が始まるまでの時期に必要であるということと一致している (Adler et al., 1994)。

では Fz の細胞内分布はどのようなになっているのだろうか。組織中での Fz の総量が

少ないこともあって、内在性の Fz 分子を検出することは困難であるが、発生時期を問わず細胞の頂部側表面と頂部側の側面の細胞膜上に分布しているという報告がある。さらに重要なのは活性化されている Fz の分布パターンであるが、リガンドが未同定なこともあり現時点では困難である。

細胞運命決定因子である細胞質タンパク Numb は、Fmi 以外で唯一、細胞内で上皮の接線方向に非対称的に分布することが知られている分子である (Jan and Jan, 1998)。成虫の感覚剛毛の前駆細胞内での Numb の細胞内分布もまた Fz により支配されていることがあきらかになっている (Gho and Schweisguth, 1998)。Numb 結合分子として分離されたタンパク PON は、Numb の細胞内局在に必須の因子であることがわかっている (Lu et al., 1998)。同様に Fmi 結合分子を同定することは、Fmi 局在化機構を解明するうえで重要なことであろう。

### 4-2-3. Fmi と Fz のアンタゴニスティックな相互作用 ～モデルの提唱～

様々な条件下での観察から、隣接する細胞間での Fz の活性の差に依存して Fmi の細胞内分布が決定されているらしいことが明らかになってきた。この考えは裏を返せば、野生型の翅上皮でも、もともと個々の細胞間に Fz 活性の差が存在していることを意味している。実際にはこのような活性の不均衡は A/P 境界を含むあらゆる細胞境界に存在するはずであり、個々の細胞はそれらの不均衡を統合して評価するシステムを持つことが予想される。

*fz* の過剰発現の結果から、野生型では個々の P/D 細胞境界の近位側（つまり個々の細胞の遠位側）でより Fz 活性が高いと予想できる。こうした Fz 活性の不均一性を生み出す機構として 2 つのモデルが提唱されている。一つは、“cell-by-cell シグナルモデル”と呼ばれる。個々の P/D 境界でリガンド分子の分泌と受容が行なわれ、細胞の近位側でのみ Fz が不活性化され、細胞内の非対称性が生じる。もう一つは、拡散性のリガンド分子が P-D 方向の濃度勾配を形成し、個々の細胞が異なる Fz 活性を持つようになる、というモデルである。

どちらのモデルにも一長一短があり現象の完全な説明はできないが、いずれにせよ個々の細胞境界での Fz 活性の差にもとづいて Fmi が P/D 細胞境界の近位側に濃縮していく。ここで Fmi のもつホモフィリックな相互作用により、P/D 細胞境界の遠位側



にも Fmi が濃縮していき、“Fmi ジッパー”を形成する。このようにして細胞境界を挟んだ Fz 活性の差という情報が、Fmi の分布へと変換されていく。ここで Fmi タンパクの分布は P-D 方向に対称的であるが、*fmi* 過剰発現の結果から、野生型の翅上皮では P/D 細胞境界の遠位側でより Fmi 活性が高いことが予想される。この状態を実現させるのに最もありそうな機構として、Fz が Fmi の活性を抑制する、というモデルを立てることができるだろう。

なぜこのように複雑なプロセスを採用しなければならないのだろうか。その理由としては、初期の Fz 活性の差が微小すぎるために細胞内骨格系の再編成を促すには不十分である、ということが考えられる。ここで、活性化型の Fmi が Fz を不活性化することができるかと仮定すると、いったん Fmi 活性の差に変換された情報が、再び Fz 活性の差を増幅することになる。増幅された Fz 活性の差が細胞内骨格系の再編成に十分なある閾値を越えると、P/D 境界の近位側での prehair の形成が始まるのだろう。

複眼の PCP 形成にも *fz* は必要である。複眼においても Fz 活性の微小な差が D-V 軸方向に存在し、Notch/Delta を介したシグナル経路によって増幅されるという報告がある (Cooper and Bray, 1999; Fanto and Mlodzik, 1999)。*fmi* も複眼の PCP 形成に必要であるので、複眼の細胞における Fmi の細胞内局在を調べることで、さらには Notch/Delta シグナル経路とのかかわりを検討することは、今後の重要な課題の一つである。

最後に、Adler のグループによる報告から提起される問題について検討しておく。彼らは *fmi/stan* がコードする cDNA を分離しているが、カルボキシ末端の配列が一部 Fmi とは異なっていた。ゲノム配列との比較から、*fmi* には少なくとも 2 つのアイソフォーム（ここでは Fmi 型と Stan 型とよぶ。）があることが予想された (Fig. 2-6)。Stan 型のカルボキシ末端は PDZ 結合モチーフのコンセンサス配列に適合することから、例えば Dsh などの PDZ ドメインをもつタンパクとの直接的な相互作用に関する可能性がある。今後は、両アイソフォームの機能的な差異について、並行して追究していく必要があると思われる。

これまでに挙げた問題点を解決していくには、いくつかの実験的検証が必要である。例えば、Fmi の活性化状態をモニターできる抗体などのプローブを作製して、各発生段階での分布パターンを追跡する必要があるだろう。また、モデルをもとにしたコンピュータシミュレーションを設計し、実現可能かどうか検討するべきである。

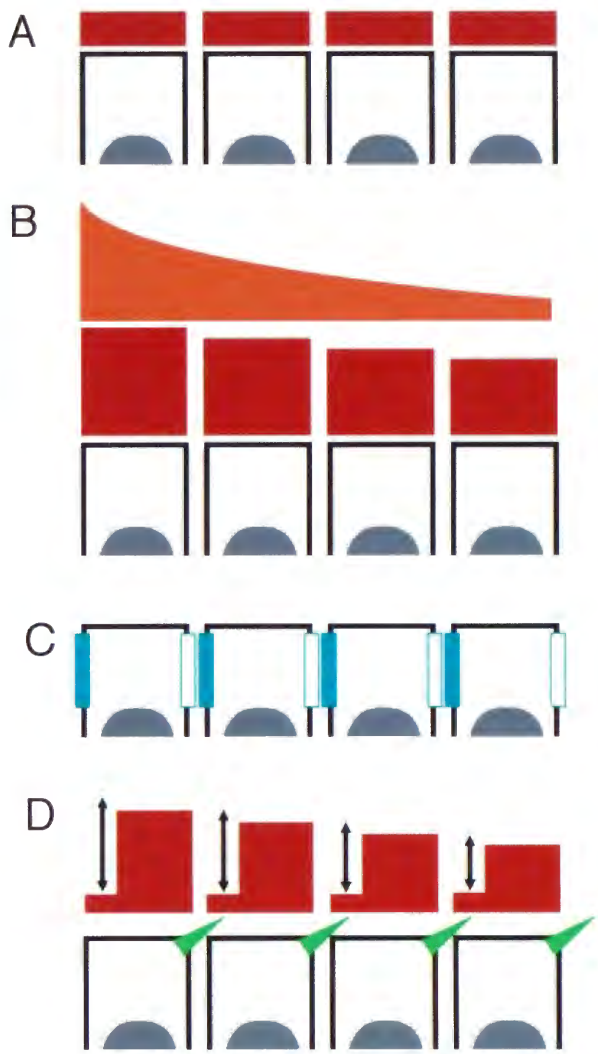


Fig. 4-8 平面内細胞極性を形成する上での Fz と Fmi との相互作用モデル

P-D 方向に並んだ上皮細胞を模式的に示した図。仮想上の Fz リガンド分子、Fz、Fmi の分布もしくは活性を合わせて図示している。(A) Fz はリガンドと結合するまでは低レベルの均一な活性しか持っていない (red bar)。(B) Fz のリガンド (orange) が P-D 方向の勾配をつくり、Fz の活性の差が生じる。なお、このモデルではそれぞれの P/D 境界に微小な Fz 活性の差しかできないことを仮定している。(C) Fmi が細胞境界に濃縮していく。ここで、Fmi は細胞の遠位側では比較的低く (open rectangle)、逆に細胞の近位側では高くなっている (closed rectangle) と想像している。(D) 細胞の近位側では Fmi の活性により Fz の活性が抑制されていく。その結果、細胞境界を挟んだ Fz 活性の差がどんどん広がっていく。Fz 活性の差が十分大きくなると、細胞の遠位側の縁で prehair の形成が始まる (green)。

## 第 5 章



# 第 5 章. 総合議論

## 5-1. Fmi による神経突起のパターン形成制御

本研究では遺伝学的な操作を利用して、神経突起のパターン形成過程における Flamingo (Fmi) の機能を解析した。その結果、軸索ガイダンスや樹状突起パターン形成において必須の役割を担うことが明らかになった。Fmi ファミリーに属する分子は、個々のモチーフの数や配列上の違いはあるものの、基本的な構造はよく似ているといえる。本研究で明らかになった機能は脊椎動物を含めた異種間でも保存されていることが予想される。

Fmi は軸索ガイダンスの様々な局面における現象に関与することがわかってきた。胚の末梢神経では軸索の伸長過程に必須であり、成虫の光受容細胞の軸索については伸長の他、走路選択や標的認識にも必要であることが示唆された。このような差異は、細胞のタイプによって Fmi の機能が使い分けられていることを意味するのかもしれない。いずれにしても、Fmi は単に成長円錐の運動性の維持などの消極的な振る舞いではなく、むしろ成長円錐の進行方向や停止位置などのより積極的な挙動のための情報の伝達に重要であることが予想される。Fmi が in vitro でホモフィリックに相互作用することから、生体内でも Fmi 分子同士の結合が軸索-軸索間での相互作用や軸索-標的細胞間での情報交換の媒体として機能することが想像される。一方で、Fmi ファミリー間でよく保存されている Fmi ボックスやシステインリッチ領域などを介して、全く別のリガンド分子とのヘテロフィリックな相互作用することが必要なのかもしれない。

本研究は、Fmi が樹状突起のパターン形成についても必須の因子であることを示した。樹状突起の形態形成メカニズムに関しては、軸索ガイダンス機構に比べてあまり機能的な解析が進んでいなかった。樹状突起の形成も軸索ガイダンスと同様なメカニズムで制御されるのだろうか、それとも本質的に異なる過程を経るのだろうか。この点を考察するうえで *fmi* 変異体の末梢神経系が示す表現型は興味深い。軸索が伸長異常を示して途中で伸長が停止してしまう一方、樹状突起は正反対に異常に伸び過ぎてしまう。これは軸索の成長円錐と樹状突起の成長円錐とでは、Fmi による細胞骨格系の制御メカニズムがまったく異なっている可能性を示唆している。表現型の回復実験

からは、ニューロンでの Fmi の発現が重要であり、樹状突起の伸長そのものには周囲の組織での Fmi の発現が必要がないことが示された。したがって、樹状突起のパターン形成においては、未知のリガンド分子と Fmi との相互作用が関与することを想像させる。Fmi の機能と細胞内分布との関係にも注目すべきであろう。樹状突起がまさに出芽する時期に Fmi タンパクがニューロンの細胞膜上の一部に濃縮するが、樹状突起との位置関係を調べることで Fmi の役割についての何らかの推論が立てられるかもしれない。そのためには、Fmi と GFP との融合タンパクを生体内で発現させ、Fmi 分布パターンの動態を検討するなどの必要があるだろう。

本研究からは、軸索走行や樹状突起パターン形成における細胞内シグナル制御メカニズムと Fmi との関係については、ほとんど情報は得られていない。一次構造から三量体 G タンパクを介したシグナル伝達系を制御していることが予想されるが、生化学的な証拠はない (補遺参照)。しかし、特定の三量体 G タンパクの活性を阻害することで、in vitro のアッセイでセマフォリン依存的な成長円錐の縮退が抑制されることが知られている (Song et al., 1998)。同様な実験系を利用して、Fmi と G タンパクとの機能的な相互作用を検討すべきであろう。神経突起の挙動とは成長円錐における細胞骨格系のダイナミックな変化を反映している。したがって、成長円錐での Fmi の空間的な分布が微小管やアクチンフィラメントの動態に影響を与えないか、などに注目する必要があると考えている。

## 5-2. Fmi による平面内細胞極性の形成

本研究により、Fmi は平面内細胞極性の形成にも必要であることが明らかになった。Fmi は上皮細胞の細胞間境界に分布するが、特定の時期にのみ P-D 軸方向に偏った分布パターンをとる。この遷移は別の 7 回膜貫通型レセプターである Fz により制御されており、細胞の極性形成と密接に関連していた。一方、Fmi 自身には Fz の活性を負に制御する活性があることを示唆する結果を得ることができた。これらの証拠をもとに一つのモデルを立てることができたが、Fmi がかわる現象の全体像を理解するためには、いくつかの未解決の問題が残されている。

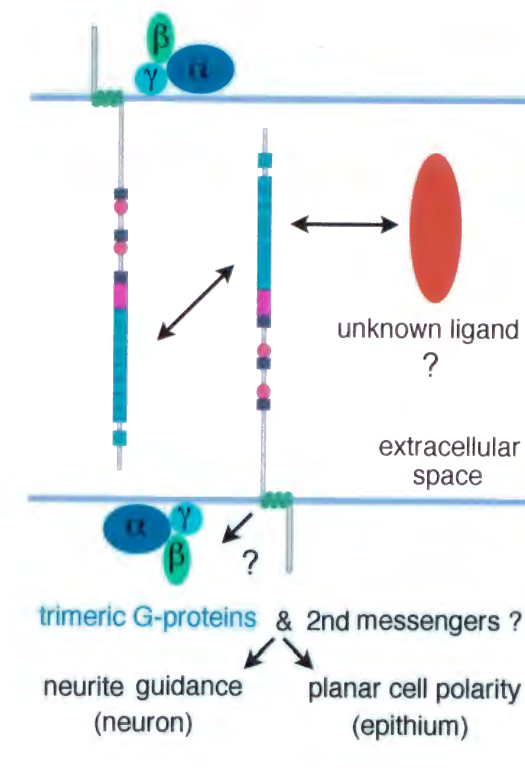
モデルで説明されるような Fz と Fmi との相互抑制的な働きによって、実際に細胞境界を挟んだ Fz 活性の差が増幅されることが理論上可能か、ということも大きな問題である。初期条件の違いによっては、増幅はせず逆にどちらの活性も低下させてしまうということもあるかもしれない。また、Fmi の不可逆的な不活性化という仮定を導入せずに、よりシンプルな説明をすることが可能かもしれない。こうした複数の可能性について、コンピュータシミュレーションなどの手段を利用することで、現実性のあるモデルであることを実証する必要があるだろう。

一方、Fz と Fmi との相互抑制的な作用が存在するとした場合、その分子の実体とはどのようなものだろうか。最も単純な描像としては、Fz と Fmi が直接結合して相互にリン酸化などの修飾を受け不活性化される、というものであろう。しかし、実際には間接的な相互作用なのかもしれない。例えば、アクチンの重合を促進するような分子に対して Fz はその活性を亢進するが Fmi は抑制する、という反応が同時進行するのかもしれない。いずれにせよ、Fz や Fmi と物理的に結合したり遺伝学的に相互作用する因子を同定した上で、それらの複合体が持つ機能を追究することが必要であらう。

### 5-3. 今後の展望

多面発現効果 (pleiotropy) とは、一つの遺伝子の突然変異によって複数の表現型が観察される現象である。その意味では、*fmi* 突然変異は多面発現効果を示すと言える。しかし、分子レベルの微視的な見方をした場合にも Fmi タンパクが本質的に異なる分子活性を発揮しているかどうかは不明である。つまり、まったく同一のシグナルカスケードの中の一つの因子として機能しているが、組織や細胞種が異なることによって、単にみかけ上異なる現象として観察されているのかもしれない。逆に、たとえ同一細胞内であっても、まったく異なるパートナー分子群と相互作用することで、本質的に異なる生命現象に関与している可能性もある。いずれの可能性も考えられるので、特定の表現型にのみ注目して機能解析を進めるよりも、見掛け上異なる表現型を同時に追究していくことが、より正確に分子メカニズムを理解することの助けになると考えられる。

今後は、まず Fmi タンパクがもつ個々の機能ドメインに、どのような活性があるのかを調べていくことが必要であらう。そして、それら機能ドメインと相互作用する他の分子群を同定し、機能的な関連性を追究することが重要である。その上で、神経突起のパターン形成における機能と上皮細胞の平面内極性の形成における機能とを比較することで、それぞれの現象における分子メカニズムの相違点と類似点とが浮かび上がるのではないだろうか (Fig.5-1)。



**Fig.5-1 Fmi の分子機能のモデル図**  
細胞集合アッセイや上皮細胞でのタンパクの分布からは Fmi 同士がホモフィリックに相互作用していることが示唆される。一方、樹状突起のパターン形成異常の表現型回復実験は、未知のリガンド分子と Fmi との相互作用を示唆している。Fmi の細胞外領域を介したこのような分子間相互作用が引き金になり、何らかの細胞内のシグナル伝達系が動員されると想像できる。例えば、三量体 G タンパクの活性化により、細胞質中のセカンドメッセンジャーの濃度変化などが生じる可能性がある。また、Fmi は細胞質領域で未知の因子と結合し、何らかのシグナルが伝達されることもありうる。そうしたシグナルが、細胞骨格系の再編成を制御し、成長円錐の形態や運動性あるいは細胞の平面内極性を調節することになるのだろう。



## 第 6 章

第 6 章. 材料と方法

6-1. 分子生物学的操作

flamingo の cDNA およびゲノム DNA のクローニング

既に分離されていた cDNA 断片 No.19 (3.5kb) をプローブに用いて、cDNA およびゲノム DNA ライブラリーのスクリーニングをおこなった。ポジティブクローンの選別は、基本的に Sambrook et al., 1989 の方法に従った。ハイブリダイゼーション溶液の組成は、50% ホルムアミド、5x SSC (20x SSCは、3M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム)、1x Denhardt's solution (0.02% polyvinylpyrrolide、0.02% Ficoll、0.002% heparin)、1% SDS (Sodium dodecyl-sulfate)、20mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.2、0.1mg/ml salmon sperm DNA である。ハイブリダイゼーションは、42℃で16時間以上おこない、洗い液は、0.5x SSC、0.1% SDSで、室温で数回すすいだ後、0.5x SSC、0.1% SDS、65℃で10分x 2 回おこなった。DNA プローブは、ランダムプライマーラベリングキット(Quick Prime、Pharmacia)で作製した。

1x10<sup>6</sup> 個のリコンビナントのスクリーニングから、複数個の cDNA クローン (λAH7 など) およびゲノム DNA クローン (λg1 など) を得た。これらの cDNA 断片を、pBluescript SK+ の EcoRI 部位にサブクローニングした。用いたライブラリーは以下の表の通りである。

<u>ライブラリー</u>	<u>材料</u>	<u>ベクター</u>	<u>プライマー</u>	<u>作製者または文献</u>
ゲノムDNA	Canton-S 胚	λFixII	-	Stratagene 社
cDNA(KZ)	胚 (9-12hr)	λgt11	randam	K. Zinn
cDNA(AH)	Oregon-R 成虫頭部	λZAPII	oligo dT and randam	L. Y. and Y. N. Jan

また、ゲノムプロジェクト (BDGP および Celera genomics) のデータベースから、*fmi* 遺伝子を含む約 143 kb のゲノム塩基配列 (AC015222) を得た。

塩基配列の決定

オープンリーディングフレームの全長を含むと考えられた cDNA クローン λAH7、λAH10-4 および λAH17-2 から、exonuclease III と Mung-bean nuclease の反応により、一連の欠失クローンを作製し、Sequenase Kit Ver.2.0 (U. S. Biochemical) および Cycle

Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) を用いて、塩基配列を決定した。

唾腺染色体の in situ ハイブリダイゼーション

cDNA クローン No.19 を、DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim) を用いて、ランダムプライマーでジゴキシゲニン標識した。唾腺染色体標本の作製、ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出は、谷村博士のプロトコル(私信)に従った。

ホールマウント RNA in situ ハイブリダイゼーション

ホールマウント RNA in situ ハイブリダイゼーション法は基本的に立井博士の方法に従った(立井、私信)。センスおよびアンチセンスプローブは、pBluescript SK+にサブクローニングした cDNA クローン No.19 から、DIG RNA labelling kit (Boehringer Mannheim)と、T3 および T7 RNA ポリメラーゼを用いて作製した。胚の固定は 3.7%ホルムアルデヒド、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.2 でおこない、プロテアーゼ K (Boehringer Mannheim) 処理は、4μg/ml で3分間おこなった。ハイブリダイゼーションは次の溶液中で行い、55℃で一晩インキュベートした。

- 50% ホルムアルデヒド
- 5x SSC
- 100μg/ml salmon sperm DNA
- 50μg/ml ヘパリン
- 0.1% Tween20

シグナルは、アルカリフォスファターゼをコンジュゲートした抗 Dig. 抗体を用いて検出した。染色した胚は、エタノール脱水しキシレンを浸透させた後、Entellan Neu (Merck) でマウントした。また、必要に応じて、エタノール脱水せず、タングステン針で正中線に沿って切り開き (flat preparation)、70% グリセロールで封入した。

RT-PCR 法による変異型 cDNA の増幅

- 1. 逆転写反応による一本鎖 cDNA の調製  
産卵後 20 ~ 24 hr の胚を回収し、体色マーカー (*y*<sup>+</sup>) を指標にしてホモ接合体を 50 個体選別する。ポリ A<sup>+</sup> RNA の回収には QuickPrep Micro mRNA Purification kit (Pharmacia Biotech) を用い付属のプロトコル通りにおこなった。RNA の抽出は最終濃度 50 embryo /200 μl になるよう Elution Buffer の量をそろえた。逆転写反応のプライマーにはランダムヘキサヌクレオチド (Pharmacia Biotech) を用い、Ready-To-Go Your-Prime



First-Strand Beads (Pharmacia Biotech) のプロトコルに従って一本鎖 cDNA を調製した。

2. PCR 法による増幅

耐熱性 DNA ポリメラーゼには KOD ポリメラーゼ (TOYOBO) を使用し、付属のバッファー (#1) に MgCl<sub>2</sub> を最終濃度 1mM になるよう加え使用した。反応サイクルはいわゆるタッチダウン法でおこなった。(タッチダウン法 : 94 ℃, 2 min → [94 ℃, 30 sec + 70 ℃, 30 sec + 72 ℃, 1 min] → [94 ℃, 30 sec + 69 ℃, 30 sec + 72 ℃, 1 min] → ... → [94 ℃, 30 sec + 50 ℃, 30 sec + 72 ℃, 1 min] → [94 ℃, 30 sec + 50 ℃, 30 sec + 72 ℃, 1 min] x 25 cycle → 72 ℃, 10 min)

3. 塩基配列の決定

19 組のプライマーを用いてオープンリーディングフレームの全長をカヴァーする cDNA を増幅した。クローニング後 Aroka DNA sequenser により両鎖の配列を決定した。独立に樹立されたアレル (E45 と E59) の塩基配列同士を比較することで、塩基置換が多型であるか突然変異であるかを識別し、突然変異した塩基置換を含む領域については独立の複数クローンの配列を調べて確認した。

6-2. タンパクの取り扱い

融合タンパク質の作製と抗原の調製

cDNA クローンから、PCR 法により増幅した断片を、発現ベクター pGEX-1λ (GST 融合タンパク用、Pharmacia) および pGEMEX-1 (T7 gene10 融合タンパク用、Promega) にサブクローニングした。以下に増幅した断片、それぞれに用いたプライマーおよび鋳型 DNA を示す(図2-8)。

増幅した断片	プライマーの塩基配列	鋳型 cDNA クローン
CR1-2	5'-GAA TTC CTG CAT CGA CGG ATC TC-3'	λAH7
	5'-GAA TTC GTC CTG ATC GGT TGC TC-3'	
CR3-6	5'-GAA TTC CGG GAG ACA TCG GAT AG-3'	
	5'-GAA TTC GGG AGC GAA GTT ATT GG-3'	
CR3-9	5'-GAA TTC CGG GAG ACA TCG GAT AG-3'	
	5'-GAA TTC GGG GCA TTG TCA TTC AC-3'	

C1-5	5'-GAA TTC ATG GGT CGC AAG GTT CCG-3'	λAH17-2
	5'-GAA TTC GGG CTT ATT CAC ACT CGG-3'	
C2-4	5'-GAA TTC CGC TGG TCC AGT CAG CTG-3'	
	5'-GAA TTC GTT CTT TAG GAG CGA GTG-3'	

それぞれのコンストラクトを、大腸菌 DH5α または BL21(DL3)/pLys S に形質転換した。その大腸菌を 1mM IPTG を含む培地で培養し、融合タンパク質を発現させた。いずれの融合タンパクも不可溶であったため、封入体 (inclusion body) を精製した。3時間発現を誘導した大腸菌 250ml を遠心して回収した。5ml の PBS + 1mM PMSF によく懸濁した後、PBS + 10mg/ml Lysozyme を 0.5ml 加え、20分間放置した。いったん -80℃で凍結させ、再び溶解した。これに超音波処理を行って、菌を十分に破碎した。遠心分離 (9800xg、20分) した後、上清を捨て、5ml PBS に再懸濁した。10% Triton X-100 を 0.5ml 加え、超音波処理した。再び遠心分離 (9800xg、20分) した後、上清を捨て、2ml PBS に懸濁し、分注して凍結保存 (-80℃) した。以上の操作はすべて 4℃で行った。なお、タンパク量は、SDS-PAGE で分離した後、CBB 染色してバンドのシグナルの強さから推定した。

ポリクローナル抗体の作製

1. 融合タンパクに対するラット抗血清の作製

精製した融合タンパク質を、PBS で 50 μg/ml に希釈した。この溶液 2ml を RIBI adjuvant (R-700) と混和し、1 回 1 匹当たり 0.5 ml ずつ、ラットの腹腔に注射して免疫した。抗体価が高くなるまで、4 週間おきにブーストした。4 回ないし 5 回ブーストした後に、解剖して心臓から全血採取した。なお、異なるベクターで作製した融合タンパクに対するウエスタンブロッティング法により、挿入したタンパク領域に対する特異的な抗体が産生されていることを確認した (Harlow and Lane、1988)。

2. カルボキシ末端のペプチドに対する抗血清の作製

予想されるカルボキシ末端のアミノ酸配列に相当するペプチド (C-QPLGPL TSITDTDSEAEY) を作製し、アミノ末端側に付加したシステインを介して、キャリアータンパク KLH に結合させた(クラボウに受託)。ペプチドの PBS 溶液 (500μg/ml) 2ml を RIBI adjuvant (R-730) と混和し、1 回 1 匹当たり 1ml ずつ、ウサギの背部皮下 10ヶ所に注射して免疫した。以後、抗体価が上がるまで 3 週間おきにブーストした。*fmi* のトランスフェクタントの粗抽出物に対するウエスタンブロッティングにより、特異性を確認した。

以下に、得られた抗血清を挙げる。

抗血清名	抗原
CR3-6B	融合タンパク CR3-6
CR3-9A	融合タンパク CR3-9
CR3-9B	融合タンパク CR3-9
C1-5A	融合タンパク C1-5
C1-5B	融合タンパク C1-5

ウエスタンブロッティング解析

解析に用いる試料を、適当な量の SDS-サンプルバッファーに溶解し、5% 2-メルカプトールを加えて5分間煮沸処理した。遠心処理 (14,000 rpm、10 分) した後、上清を SDS-PAGE (5-10% ポリアクリルアミドゲル) で分離し、ニトロセルロース膜にブロッティングした。バッファーには、トリス-グリシンバッファーを用いた。ブロッキングおよび抗体のインキュベーションには、5% スkimミルクを含む TBS+1mM CaCl<sub>2</sub>を用いた。シグナルの検出には、ECL Western Blotting Detection System (Amersham)を使い、X 線フィルムに感光させた。

300 kDa 以上の高分子量タンパクのブロッティングには、電気泳動用のバッファーとブロッティング用のバッファーをトリス-酢酸バッファーに換えて行った (Bolt and Mahoney, 1997)。

免疫沈降

操作はすべて氷上もしくは4℃で行った。ブリーチ処理してコリオンを除去した胚 (約 0.4 mg) を 1ml のExtraction Buffer (TBS with 1% Triton X-100, 1% NP-40, protease inhibitor) 中でホモジェナイズし、30 分間インキュベーションした。遠心分離後、上清を 500 μl の Sepharose 4B CL (Pharmacia) とインキュベーションした。30 分後に再び遠心分離し、上清を半量ずつ分注した。一方には実際に免疫沈降させたいタンパクに対する抗体を、一方には対照として標準ラット血清をそれぞれ適切な濃度になるよう加えた。1 時間震盪した後、50 μl の anti-rat IgG conjugated Sepharose 4B beads (Zymed) を加え、さらに1 時間震盪した。このビーズを、protease inhibitor を含まない Extraction Buffer で3 回洗った後、5% 2-メルカプトールを含む 100 μl の SDS sample bufer 中で3 分間煮沸して回収した。

6-3. 組織学的操作

胚のホールマウント染色

ドライイーストペーストを塗ったグレイププレートを用いて、ステージを合わせた胚を回収し、0.7% NaCl+0.3% Triton X-100でよく洗った。次に、50% ブリーチで4分間処理してコリオンを溶解した。固定には、PBS+4% パラホルムアルデヒドを用い、等量のヘプタンを重層して、15分間激しく旋回した。次に、ヘプタンを除いた後、メタノールを加えて10秒間振盪することでピテリン膜を除いた。続いてエタノール (95、70および30%) で穏やかに水和した後、PT (PBS+0.1% Triton X-100) で洗浄した。ブロッキングおよび抗体のインキュベーションには、PT+2% BSA (PENTEX) を用いた。30分のブロッキング後、一次抗体を加え、4℃で一晩インキュベートした。PT で10分 X 5 回洗浄した後、HRP 標識した二次抗体を加え、室温で90分インキュベートした。PT で10分 X 5回洗浄した後、0.5mg/ml DAB、0.03% 過酸化水素水を含む 0.2M Tris-HCl pH7.2 中で約20分間発色させた。PT で洗浄後、エタノール脱水した後キシレンで透明化し、Entellan Neu (Merck)で封入した。また、場合に応じて Elite ABC kit (Vectastain) を用いた ABC 法により検出感度を上げた。必要な場合は、背側の正中線で切り開き、体壁を水平にした、開きのサンプルを作製し、観察した。観察には、ノマルスキー顕微鏡としてAxiophoto (Zeiss) を使用した。また、蛍光標識する場合は、Cy3 標識した二次抗体を用い、二重染色する際は、Texas Red 標識した二次抗体とビオチン標識した二次抗体を用い、ストレプトアビジン-FITC を三次抗体に用いた。また、標本は、退色防止剤 (0.01% パラフェニレンジアミン) 入りの90% グリセロールでマウントし、蛍光顕微鏡およびコンフォーカルレーザー顕微鏡で観察した (Patel, 1994)。

三齢幼虫の中樞神経系のホールマウント染色

PBS 中で解剖したのち、氷上の PLP 固定液 (75mM L-lysine, 10mM NaIO<sub>4</sub>, 2% PFA in PB pH7.4) 中で終夜固定した。抗体反応以後は胚の場合と同様に行う。

蛹期の翅原基の染色

PBS 中で囲蛹殻から蛹を取出し、氷上の固定液 (4% PFA in PBS pH7.4) 中で 2hr 固定する。固定後 PBS で洗ったのち、PBT 中で蛹クチクラを剥がす。抗体反応以後は胚の場合と同様に行う。



成虫頭部の凍結切片の抗体染色

羽化後 1 日目の成虫の頭部をナイフで切り落とし 4% パラホルムアルデヒド液中で 4 時間室温固定する。PBS で洗浄したのち、5 %, 10 %, 15 %, 20 % スクロース溶液にそれぞれ 1 時間ずつ室温で置き換え、30 % スクロース溶液中で終夜震盪する。次に OCT コンパウンドに置き換え、液体窒素 (-194℃) 中で凍結する。1 日 -80℃ で放置した後、クリオスタットで 10 μm 厚の切片を作製し、APS コートしたスライドガラスに張り付け風乾させる。抗体反応以後は胚の場合と同様に行う。

用いた抗体

名前	動物種	モノ／ポリ	希釈率 染色	ウエスタン	製造者
<hr/>					
抗 Fmi 抗体					
CR3-9A	ラット	ポリ	1:1000	1:1000	
C1-5A	ラット	ポリ	1:1000	1:1000	
#74	マウス	モノ	1:5-10	1:5-10	
抗 HRP 抗体	ウサギ	ポリ	1:300		Cappel 社
1D4 (抗 FasII)	マウス	モノ	1:20		
22C10	マウス	モノ	1:20		
24B10	マウス	モノ	1:20		
抗 c-myc 抗体	マウス	モノ	1:100		Santa Cruz 社
抗 CD2 抗体	マウス	モノ	1:100		Serotec 社
<hr/>					
ファロイジン			1:100		Molecular Probe 社

6-4. 材料

S2 細胞培養

ショウジョウバエの培養細胞 S2 (Schneider's cell line 2)は、1x Schneider's medium (GIBCO BRL) に非働化した牛胎仔血清 (FCS) 10% を加えた培養液で培養した。25℃の空気下で、細胞培養用シャーレやフラスコを用いてインキュベートした。  
アフリカミドリザルの腎臓由来の細胞株 COS-7 は、DH10 (5g DMEM, 5.3g HamF12, 2.1g NaHCO<sub>3</sub>, 3.5g glucose, 100 ml FCS in 1000 ml D<sub>3</sub>W) 中で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の気相で培養し

た。

S2 細胞のトランスフェクション

*fmi* を S2 細胞に誘導的に発現させるために、発現用プラスミド *fmi*-pRmHa3を以下の段階を経て作製した。まず、λAH10-4 の AvrII 部位と λAH17-2 の NheI部位の間の配列を Pfu ポリメラーゼを用いた PCR 法により増幅した (TA10)。以下に、用いたプライマーを列挙する。

増幅した断片	プライマーの塩基配列
λAH10-4 の 3'末端	5'-AAG CTT CCT AGG ATT GGA CAT CGT C-3' 5'-TCA AAC TTA CGA CGA TCC-3'
λAH17-2 の5' 末端	5'-GCT AGC TCT ACA TCC ACG C-3' 5'-GAC CAG TGA TTA GCT TCC-3

次に、λAH17-2 と、TA10 とを接続した(断片1)。さらに、断片1と λAH10-4 とを接続した(断片2)。一方、N0.19 の 5' 側と λAH7 の3' 側を接続した(断片3)。最後に、pGEM9-zf(-) の NotI および SfiI 部位に、断片2、断片3の順にサブクローニングした (CAD47B-pGEM9-zf(-))。次にCAD47B-pGEM9-zf(-) の SfiI 部位を切断し平滑化した後、NotI 部位を切断した。この断片を、改変型の pRmHa3 (岩井未発表) の NotI および SmaI部位に挿入した (CAD47B-pRmHa3)。

このプラスミドをアマニチン耐性遺伝子を持つプラスミド pPC4 (Jokerst et al., 1989) とS2 細胞にコトランスフェクションした。トランスフェクションはリン酸カルシウム法で行った (Nagafuchiら、1989)。トランスフェクトした細胞を、5μg/ml αアマニチン (Sigma) の存在下で10日間培養した。発現の誘導は 0.7mM になるよう CuSO<sub>4</sub>を加えて行った。また、細胞のクローニングは限界希釈法によった。この際、培地には 50% conditioned mediumを用いた (Ashburner、1989)。

また高いレベルで発現させたい場合には、pUAST に組み込んだコンストラクトを、pRK245 (アクチン 5C プロモーター依存的に *GAL4* を発現する) と 9 : 1 の DNA 比で同時に導入した。

細胞集合アッセイ

トランスフェクタントを一晩発現を誘導した後、ピペッティングで回収して1x Schneider's medium で 2 回洗浄した。細胞密度が 1x10<sup>7</sup> cell/ml になるように再び懸濁した。この細胞懸濁液を24- ウェルプレートに 500 μl ずつ分注し、150 rpm で旋回しながら

ら室温で3~18時間インキュベーションした。

COS-7細胞を用いたcAMPアッセイ

COS-7細胞へのトランスフェクションはエレクトロポレーション法によった。増殖期の細胞5x10<sup>6</sup> cellを0.5 mlのK-PBS(+)に懸濁し、40 µgのDNAと混合して氷上で15分間インキュベーションした。エレクトロポレーションの条件は、電位差250 V、電気容量940 µFで、電極間隙0.4 cmのキュベット(0.4 cm DISPOSABLE CELL CHAMBER, RIKOH KAGAKU)を用いて行った(装置:RIKOH KAGAKU, ECB 1202)。通電後、軽く混合してから氷上で7分間インキュベーションし、1 mlのDH10に懸濁してから10 cmシャーレに播種した。

pcDNA3.1(+)のNotIとXbaI部位にfmi cDNAを挿入したコンストラクト(fmi/pcDNA3.1(+))もしくはrat secretin receptor発現用コンストラクト(pQ17)をCOS-7に導入し10 cmシャーレで24時間培養した後、24-ウェルプレートにウェル当たり500 µlずつ播種し直し、さらに24時間培養する。500 µl IBMXs(無血清DMEM, 1mM IBMX, 0.1% BSA)で2回洗浄してからIBMXsを200 µl加え、5倍濃度のFmi(EX)-Fcコンディションドメディウム(後述)もしくはペプチド溶液を添加する。CO<sub>2</sub>インキュベーター内で60分間培養した後、10% TCAを250 µl加え反応を停止させてから-20℃で凍結させた。再び融解してから1.5 mlチューブに移し、5000 rpm, 5 min遠心分離する。上清のうち150 µlをガラス試験管(12 x 75 mm)に移し350 µlのD<sub>3</sub>Wを加え混合する。TCAを除去するため水飽和ジエチルエーテルを1 ml加えよく混和した後2000 rpm, 5 secで遠心分離し上層を捨てる。この操作をもう一度繰り返してからドラフト内でジエチルエーテルを気化させて除去する。この各サンプル中のcAMP濃度を cAMP [<sup>125</sup>I] assay system (Amersham) に付属のプロトコルにしたがって測定した。ガンマ線量はシンチレーションカウンターを用いて測定した。

COS-7細胞を用いたFmi(EX)-Fc融合タンパクの作製

(a) Fmi細胞外領域(1~2,769 a.a.)とヒトIgG Fc領域との融合タンパクの作製

まず以下のプライマーを用いて、PCRにより細胞外領域のカルボキシ末端部分のcDNAを増幅しサブクローニングした。細胞外領域のアミノ末端部分のcDNAを含むベクターに移し替えてから、発現ベクターpEF-Ig Fcにサブクローニングした。配列が変化していないことを確認したコンストラクトをpEX-Fcと名付けた。

プライマー

AvrII-fw: 5'-ATG GCC CTA GGA TTG GAC-3'

Fc-NotI: 5'-GGC GGC CGC CTC ACC GTC GGG AAT CTC AGT TTG-3'

(b) 融合タンパクの精製

pEX-FcをCOS-7細胞にトランスフェクションして、Fmi(EX)-Fc融合タンパクを発現させた。この培養上清をとってコンディションドメディウムとした。また融合タンパクはイムノグロブリンのFc領域を持っているので、プロテインAカラム(Pharmacia)を用いて精製した。

ショウジョウバエ

ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)は、25℃もしくは17℃で飼育した。野生型として、Oregon-Rを用いた。染色体バンド47B 4-8付近を欠失している以下の株を解析に用いた。

	break point
<i>Df(2R)12</i>	(46F; 47AB)
<i>Df(2R)17</i>	(47A; 47F)
<i>Df(2R)E3363</i>	(47A; 47E)
<i>Df(2R)Stan2</i>	(47A; 47D)

flamingo(fmi)点突然変異体のスクリーニング

染色体領域47Bを欠失した株*Df(2R)17*と相補しない劣性致死変異株のコレクション(234株)を、R. BurgessとT. Schwartz博士(Stanford Univ.)らが樹立していた。このコレクションから、以下の方法により、fmi変異株と想定される株を分離した。

1. 抗体染色パターンの変化によるスクリーニング

コレクションから任意の24株を抽出し、それらの胚を抗血清CR3-9Aを用いて抗体染色した。そのうち3株(E42, E45およびE59)で、中枢神経系のニューロパイルのシグナルが消失しており、fmi変異株と仮定した。

2. 相補性試験によるスクリーニング

コレクションのすべての株とfmi変異株の候補E42とを掛け合わせて、致死性の回復しない31株を分離した。

トランスジェニックフライの作製

1. 発現ベクターの作製



pUAST のXbaI 部位を平滑化した後、NotI 部位で切断した。一方、*fmi*-pGEM9-zf(-) の SfiI 部位を平滑化した後 NotI 部位で切断し挿入断片を回収した。この断片を、pUAST にサブクローニング (*fmi*-pUAST)。

細胞外領域の大半である 55 番目から 2,769 番目までのアミノ酸までの領域を欠失し、かつカルボキシ末端に myc エピトープタグを付加した改変分子 ( $\Delta Ex$ )を強制発現させるため、以下の方法でコンストラクトを作製した。まず、*fmi*-pGEM9-zf(-) を鋳型にして、次のプライマーによって二つの断片を増幅した。

増幅した断片	プライマーの塩基配列
断片1	5'-GGC GGC CGC GTC ATG CAA ACG AGG GAG-3' 5'-GAA TTC GGA ACC AAG TTT ATA GAC-3'
断片2	5'-GAA TTC GAT GGA GAC TTT AAT CC-3' 5'-TCA GTT CAG GTC TTC TTC AGA GAT CAG TTT CTGCTCATA TTC CGC CTC TGA GTC-3'

個々の断片を pCR2.1 (Stratagene) にクローニングした後、断片1を、pGEM9zf(-)の NotI 部位とEcoRI 部位に挿入した後、断片2を EcoRI 部位に挿入した( $\Delta Ex$ -pGEM9zf(-))。  $\Delta Ex$ -pGEM9zf(-)のNotI、SfiI 断片を全長の場合と同様にして、pUAST に挿入した ( $\Delta Ex$ -pUAST)。

2. 宿主株へのコンストラクトの導入

*fmi*-pUAST あるいは  $\Delta Ex$ -pUAST と、トランスポゼースを発現するコンストラクト pTurbo とを10:1 の比で混合し、*y w* のハエから集めた卵の後極にマイクロインジェクションした。得られたトランスジェニック株を以下に挙げる。

株	トランスジーン	トランスジーンが挿入された染色体
<i>fmi</i> -#1	<i>UAS-fmi</i>	第 3 染色体
$\Delta Ex$ -#1	<i>UAS-<math>\Delta Ex</math></i>	N.D.
$\Delta Ex$ -#2	<i>UAS-<math>\Delta Ex</math></i>	N.D.
$\Delta Ex$ -#3	<i>UAS-<math>\Delta Ex</math></i>	N.D.
$\Delta Ex$ -#4	<i>UAS-<math>\Delta Ex</math></i>	N.D.

トランスジーンによる表現型の回復

胚期の神経系にみられる表現型を回復させるためのレスキュー個体は、以下のかけ合わせにより作製した。

(1) 中枢神経系の軸索走行の異常の回復

*y w/Y; fmi<sup>E45</sup> GAL4-1407/CyO P[y<sup>+</sup>] × y w; fmi<sup>E59</sup>/CyO P[ftz-lacZ]; UAS-fmi/+*

→ *y w; fmi<sup>E45</sup> GAL4-1407/fmi<sup>E59</sup>; UAS-fmi/+*

(2) 末梢神経系の樹状突起のパターン異常の回復

*y w/Y; fmi<sup>E59</sup> IH1-GAL4 UAS-GFP/+; UAS-fmi/+*

× *y w; fmi<sup>E59</sup> IH1-GAL4 UAS-GFP/+; UAS-fmi/+*

→ *y w; fmi<sup>E59</sup> IH1-GAL4 UAS-GFP; UAS-fmi*

*fmi* 挿入変異体の作出の試み（実際には作出できず）

P エLEMENT のローカルトランスポジションによる挿入変異の誘発

ゲノム中に P エLEMENT をもつ株に、トランスポゼース( $\Delta 2$ -3) を持つ株を掛け合わせ、近傍に再挿入させることが可能である (Hamilton et al., 1991; Hamilton and Zinn, 1994)。この方法を利用して*cad47B* の近傍に P エLEMENT が挿入した株の作製を試みた。なお、エンハンサートラップ株 C3-2nd-10 は、第2染色体右腕のバンド 47B1-4 に P エLEMENT P[lacW]を持つ株で、オレンジ眼である。

1. エンハンサートラップ株 C3-2nd-10 とトランスポゼース ( $\Delta 2$ -3) を持つ株の掛け合わせ

♂ *y w/Y; P<sup>C3-2nd-10</sup>[w<sup>+</sup>:lacZ]/CyO; +/+ × ♀<sup>v</sup> *y w; +/+; TM2,Ubx,P[ $\Delta 2$ -3]/TMS,Sb,P[ $\Delta 2$ -3]**

オレンジ眼

↓モザイク眼を選択(300系統)。

♂ *y w/Y; P<sup>C3-2nd-10</sup>[w<sup>+</sup>:lacZ]/+; TM2,Ubx,P[ $\Delta 2$ -3]/+ or TMS,Sb,P[ $\Delta 2$ -3]/+*

× ♀<sup>v</sup> *w; Sco/CyO; +/+*

↓

第 II 染色体に2コピーの P エLEMENT を持つ株の選択。

オレンジ眼から赤眼になったハエを選ぶ。

♂ *w/Y; P\*[w<sup>+</sup>:lacZ]/CyO; +/+ × ♀<sup>v</sup> *w; Sco/CyO; +/+ .....(A)**

赤眼

or

♂ *w/Y; Sco/CyO; +/+ × ♀<sup>v</sup> *yw/w; P\*[w<sup>+</sup>:lacZ]/CyO; +/+ .....(A)**

赤眼

(赤眼を計143系統分離した)

↓  
♂ w/Y; P\*[w<sup>+</sup>:lacZ]/CyO × ♀<sup>v</sup> w; P\*[w<sup>+</sup>:lacZ]/CyO  
(系統の維持)

2. 再挿入株からのプラスミドレスキュー

掛け合わせ (A) に用いた赤眼の個体からゲノム DNA を回収した。まず、20個体をひとつのサブプールとして1.5ml エッペンチューブにいれて、液体窒素中で凍結させた。次に、グラインドバッファー (5% スクロース、80mM NaCl、100mM Tris-HCl pH8.5、0.5% SDS、50mM EDTA) を 200μl 加えてペッスルで搗り潰した。ホモジネートを70℃で30分インキュベートした後、35μl の 8M KOAc を加えて氷上で30分放置した。沈殿を遠心分離してから、イソプロパノール 150μl を加えて DNA を沈殿・回収し、0.1mg/ml の RNaseA を含む 100μl の TE に溶解した。それぞれのサブプールのゲノム DNA 3μg を EcoRI で切断した後、3ml のバッファー中で、T4 DNA ligase (New England Biolab) を用いて一晩セルフライゲーションさせた。2-ブタノールで 400μl 程度に濃縮し、エタノール沈殿させた。次に、300μl のD.W. に溶解して、micro-con 100 (amicon) を用いて、脱塩・濃縮した。コンセントレーターで乾燥させてから、30μl の D<sub>3</sub>W に溶解した。セルフライゲーションさせた DNA を、エレクトロポレーション法により大腸菌 LE392 に形質転換した。エレクトロポレーションは、Gene Pulser (BIO RAD) を用いて、電極間距離 0.2cm、最高電圧 2.5kV、コンダクタンス 25μF、抵抗 200Ω で行い、時定数は 4.8sec 程度であった。形質転換した菌は、SOC 培地中で 1 時間インキュベートしてからプレーティングした。各サブプールごとにコロニーを回収して、アルカリ法によりプラスミドを得た。

3. サザンブロッティング法によるスクリーニング

各サブプールから得たプラスミドを EcoRI で切断した後、0.7% アガロースゲルで分離し、ナイロン膜にブロッティングした。一方、cDNA クローンを放射性ラベルし、プローブとした。ハイブリ液の組成は、スクリーニングの項で述べたものと同じである。サザン解析の結果、2つのサブプールが、新たに *fmi* 遺伝子の近傍に P エlement が再挿入された株を含んでいた。次に、これらのサブプールに含まれるすべての株から、ゲノム DNA を回収し、その EcoRI 断片 に対して、cDNA クローンをプローブにしてサザンブロッティングを行った。

6-6. 別表

Table-1 *fmi* 突然変異系統

分離した 31 系統の突然変異について、致死性、表現型の優／劣性、抗 EX 抗体による染色パターンについて整理した。(n.d.: not determined, +: staining positive, -: staining negative)

allele	lethality (%)	mutation		α-Ex staining
		CNS	PCP	
E41	100	n.d.	dominant	+
E42	100	n.d.		-
E45	100	null (missense)		-
E59	100	null (nonsense)		-
E66	100	n.d.	dominant	+
E84	100	n.d.		-
E86	95	n.d.	dominant	+
E88	100	n.d.		-
E89	100	n.d.		-
E96	100	n.d.		-
E100	100	n.d.		+
E103	100	n.d.		-
E112	100	n.d.		+
E123	100	n.d.		-
E129	100	n.d.		-
E132	100	n.d.		-
E143	100	n.d.		-
D4	100	n.d.		+
D13b	100	n.d.		+
D14	100	n.d.		-
D33	95	n.d.		+
D42	100	n.d.	dominant	+
D55	100	n.d.		-
D70	100	n.d.		-
D77	95	n.d.		-
D101	100	n.d.		+
D106	100	n.d.		-
D121	100	n.d.		-
D122	100	n.d.		-
D142	100	n.d.	dominant	+
D143	100	n.d.		-
D152	100	n.d.		+
D156	100	n.d.		-



## 補遺. Fmi と 3 量体 G タンパクは共役するのか

### 補-0. はじめに

Fmi は 7 回膜貫通領域をもち、セクレチンレセプターファミリーと高い相同性を示す。セクレチンレセプターファミリーに属する分子の多くは、内分泌因子であるペプチドホルモンをリガンドとしている。いくつかのメンバーについてはリガンドとの結合により活性化し、細胞内の cAMP 濃度の上昇や  $IP_3$  濃度の上昇を誘導することが知られている。また、このとき特定の 3 量体 G タンパクが関与していることが示唆されている例もある。Fmi についても活性化に伴い同様の細胞内シグナル伝達経路が駆動される可能性があるだろう。しかし、いくつかの問題がある。たとえば活性化に必要な刺激とは、そもそも何らかのリガンド分子との相互作用なのだろうか。またリガンド分子が Fmi 自信である、つまりホモフィリックな結合が活性化の引き金になる可能性も考えられよう。これらの事情を考慮しながら、以下のようにして培養細胞を用いた解析を試みた。

### 補-1. 結果

#### 補-1-1. ホモフィリックな相互作用と Fmi の活性化

セクレチンレセプター（以後 sec-R と略す）の解析例にならって、アフリカミドリザルの腎臓由来の細胞株 COS-7 を用いた in vitro でのアッセイ系を利用した。sec-R を導入した細胞を生理的濃度のセクレチンペプチドに曝すと、細胞内の cAMP 濃度の上昇が誘導される。まず *fmi* を導入しただけの COS-7 細胞について細胞内の cAMP 濃度を測定したが、変化は見られなかった。つまり、過剰に存在するだけではこの系の活性化を誘導できないことがわかった。次に、Fmi の細胞外領域について、ヒト免疫グロブリン重鎖もしくはヒト胎盤由来アルカリフォスファターゼとの融合タンパクを作製した。この組換えタンパクを仮想上のリガンド分子として、*fmi* 導入細胞の培地中に様々な濃度で加えてみた。しかしいずれの場合にも、細胞内の cAMP 濃度の上昇は検出できなかった。

### 補-2. 考察

#### 補-2-1. 解析の問題点

ここで行った in vitro の解析は、当然ながらいくつかの問題点と限界をもつ。まず、系

統的に遠い種の株細胞を用いている点である。Fmi の活性化に必要な分子群がすべて揃い、かつ十分に機能しうる状態にあるという保証はない。また、細胞外領域の分子が内在性分子と同様のコンフォメーションをもつ機能分子であるかどうか不明である。さらに、実際には全く別の分子がリガンドとして働いていることも十分ありうることである。また、例えば Fmi の活性化が誘導するのは cAMP 濃度ではなく IP<sub>3</sub> 濃度の上昇かもしれない、という可能性もある。このような点に注意しながら、Fmi の活性化と三量体 Gタンパク経路との関係をさぐる必要があろう。

## 参考文献

Adler, P. N. (1992). The genetic control of tissue polarity in *Drosophila*. *Bioessays* *14*, 735-741.

Adler, P. N., Charlton, J., Jones, K. H., and Liu, J. (1994). The cold-sensitive period for *frizzled* in the development of wing hair polarity ends prior to the start of hair morphogenesis. *Mech. Dev.* *46*, 101-107.

Adler, P. N., Krasnlw, R. E., and Liu, J. (1997). Tissue polarity points from cells that have higher Frizzled levels towards cells that have lower Frizzled levels. *Curr. Biol.* *7*, 940-949.

Ashburner, M. (1989). Cloning by limit dilution in conditioned medium. *Drosophila a laboratory manual protocol* *62*, 138.

Axelrod, J. D., Miller, J. R., Shulman, J. M., Moon, R. T., and Perrimon, N. (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev.* *12*, 2610-2622.

Bashaw, G. J., and Goodman, C. S. (1999). Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of Slit and Netrin receptors specify attraction versus repulsion. *Cell* *97*, 917-926.

Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J., and Nusse, R. (1996). A new member of the Frizzled family from *Drosophila* functions as a Winglessreceptor. *Nature* *382*, 225-230.

Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T., Grell, E., and al, e. (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes Dev* *3*, 1273-87.

Bockert, J., and Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* *18*, 1723-1729.

Bolt, M. W., and Mahoney, P. A. (1997). High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* *247*, 185-192.

Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I., and Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and *wingless* signaling. *Cell* *94*, 109-118.

Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* *118*, 401-415.

Chae, J., Kim, M. J., Goo, J. H., Collier, S., Gubb, D., Charlton, J., Adler, P. N., and Park, W. J. (1999). The *Drosophila* tissue polarity gene *starry night* encodes a member of the protocadherin family. *Development* *126*, 5421-5429.

Chiba, A., and Keshishian, H. (1996). Neuronal pathfinding and recognition: roles of cell adhesion molecules. *Dev*



Clark, H. F., Brentrup, D., Schneitz, K., Bieber, A., Goodman, C., and Noll, M. (1995). Dachous encodes a member of the cadherin superfamily that controls imaginal disc morphogenesis in Drosophila. Genes & Dev. 9, 1530-1542.

Cooper, M. T., and Bray, S. J. (1999). Frizzled regulation of Notch signaling polarizes cell fate in the Drosophila eye. Nature 397, 526-530.

Desai, C. J., Gindhart, J. G. J., Goldstein, L. S., and Zinn, K. (1996). Receptor tyrosine phosphatases are required for motor axon guidance in the Drosophila embryo. Cell 84, 599-609.

Dunne, J., Hanby, A. M., Poulson, R., Jones, T. A., Sheer, D., Chin, W. G., Da, S. M., Zhao, Q., Beverley, P. C. L., and Owen, M. J. (1995). Molecular cloning and tissue expression of FAT, the human homologue of the Drosophila fat gene that is located on chromosome 4q34-q35 and encodes a putative adhesion molecule. Genomics 30, 207-23.

Eaton, S. (1997). Planar polarization of Drosophila and vertebrate epithelia. Curr. Opin. Cell Biol. 9, 860-866.

Eaton, S., Wepf, R., and Simons, K. (1996). Roles for Rac1 and Cdc42 in planar polarization and hair outgrowth in the wing of Drosophila. J. Cell Biol. 135, 1277-1289.

Fanto, M., and Mlodzik, M. (1999). Asymmetric Notch activation specifies photoreceptors R3 and R4 and planar polarity in the Drosophila eye. Nature 397, 523-526.

Fredieu, J. R., and Mahowald, A. P. (1989). Glial interaction with neurons during Drosophila embryogenesis. Development 106, 739-748.

Fujita, S. C., Zipursky, S. L., Benzer, S., Ferrus, A., and Shotwell, S. L. (1982). Monoclonal antibodies against the Drosophila nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7929-7933.

Gao, F. B., Brenman, J. E., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1999). Genes regulating dendritic outgrowth, branching, and routing in Drosophila. Genes Dev. 13, 2549-2561.

Garrity, P. A., Lee, C. H., Salecker, I., Robertson, H. C., Desai, C. J., Zinn, K., and Zipursky, S. L. (1999). Retinal axon target selection in Drosophila is regulated by a receptor protein tyrosine phosphatase. Neuron 22, 707-717.

Garrity, P. A., Rao, Y., Salecker, I., McGlade, J., Pawson, T., and Zipursky, S. L. (1996). Drosophila photoreceptor axon guidance and targeting requires the Dreadlocks SH2/SH3 protein. Cell 85, 639-650.

Gho, M., and Schweisguth, F. (1998). Frizzled signaling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in Drosophila. Nature 393, 178-181.

Gomez, T. M., and Spitzer, N. C. (1999). In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. Nature 397, 350-355.

Goodman, C. S., and Doe, C. Q. (1993). Embryonic development of the Drosophila central nervous system. The development of Drosophila melanogaster 2, 1131-1206.

Goodman, C. S., and Shatz, C. J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. Cell/Neuron Suppl. 72/10, 77-98.

Gub, D., Green, C., Huen, D., Coulson, D., Johnson, G., Tree, D., Collier, S., and Roote, J. (1999). The balance between isoforms of the Prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in Drosophila imaginal discs. Genes Dev. 13, 2315-2327.

Gubb, D. (1998). Cellular polarity, mitotic synchrony and axes of symmetry during growth. Where does the information come from? Int. J. Dev. Biol. 42, 369-377.

Gubb, D., and Garcia-Bellido, A. (1982). A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in Drosophila melanogaster. J. Embryol. Exp. Morphol. 68, 37-57.

Hadjantonakis, A. K., Formstone, C. J., and Little, P. F. R. (1998). MCelsr1 is an evolutionarily conserved seven-pass transmembrane receptor and is expressed during mouse embryonic development. Mech. Dev. 78, 91-95.

Hamilton, B. A., Palazzolo, M. J., Chang, J. H., VijayRaghavan, K., Mayeda, C. A., Whitney, M. A., and Meyerowitz, E. M. (1991). Large scale screen for transposon insertions into cloned genes. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 2731-5.

Hamilton, B. A., and Zinn, K. (1994). From clone to mutant gene. Methods Cell Biol 44, 81-94.

Harlow, E., and Lane, D. (1988). Antibodies: a laboratory manual. CSH Laboratory.

Harris, R., Sabatelli, L. M., and Seeger, M. A. (1996). Guidance cues at the Drosophila CNS midline: identification and characterization of two Drosophila netrin/UNC-6 homolog. Neuron 17, 217-228.

Hartenstein, V. (1993). Atlas of Drosophila development. The Development of Drosophila melanogaster Suppl.

Hing, H., Xiao, J., Harden, N., Lim, L., and Zipursky, S. L. (1999). Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in Drosophila. Cell 97, 853-863.

Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S., and Takeichi, M. (1992). Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. Cell 70, 293-301.

Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. Bioinformatics 14, 378-379.

Ishihara, T., Nakamura, S., Kaziro, Y., Takahashi, T., Takahashi, K., and Nagata, S. (1991). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. EMBO J. 10, 1635-1641.

Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K., and Nagata, S. (1992). Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. Neuron 8, 811-19.

Iwai, Y., Usui, T., Hirano, S., Steward, R., Takeichi, M., and Uemura, T. (1997). Axon patterning requires DN-cadherin, a novel neuronal adhesion receptor, in the Drosophila embryonic CNS. *Neuron* 19, 77-89.

Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in Drosophila and grasshopper embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2700-2704.

Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1998). Asymmetric cell division. *Nature* 392, 775-778.

Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1993). The peripheral nervous system. The development of Drosophila melanogaster 2, 1207-44.

Jokerst, R. S., Weeks, J. R., Zehring, W. A., and Greenleaf, A. L. (1989). Analysis of the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase II in Drosophila. *Mol Gen Genet* 215, 266-275.

Jones, K. H., Liu, J., and Adler, P. N. (1996). Molecular analysis of EMS-induced *frizzled* mutations in Drosophila melanogaster. *Genetics* 142, 205-215.

Kolodziej, P. A., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1995). Mutations that affect the length, fasciculation, or ventral orientation of specific sensory axons in the *Drosophila* embryo. *Neuron* 15, 237-86.

Kolodziej, P. A., Timpe, L. C., Mitchell, K. J., Fried, S. R., Goodman, C. S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996). *frazzled* encodes a *Drosophila* member of DCC immunogloblin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 87, 197-204.

Krasnow, R. E., Wong, L. L., and Adler, P. N. (1995). Dishevelled is a component of *frizzled* signaling pathway in Drosophila. *Development* 121, 4095-4102.

Krueger, N. X., Van Vactor, D., Wan, H. I., Gelbart, W. M., Goodman, C. S., and Saito, H. (1996). The transmembrane tyrosine phosphatase DLAR controls motor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* 84, 611-22.

Kunes, S., Wilson, C., and Steller, H. (1993). Independent guidance of retinal axons in the developing visual system of Drosophila. *J. Neurosci.* 13, 752-767.

Landgraf, M., Bossing, T., Technau, G. M., and Bate, M. (1997). The origin, location, and projection of the embryonic abdominal motoneurons of Drosophila. *J. Neurosci.* 17, 9642-9655.

Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M., and Soares, M. B. (1996). The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* 33, 151-152.

Lin, D. M., Fetter, R. D., Kopczynski, C., Grenningloh, G., and Goodman, C. S. (1994). Genetic analysis of Fasciclin II in Drosophila: defasciculation, refasciculation, and altered fasciculation. *Neuron* 13, 1055-69.

Lu, B., Rothenberg, M., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1998). Partner of Numb colocalizes with Numb during mitosis and directs Numb asymmetric localization in Drosophila neural and muscle progenitors. *Cell* 95, 225-235.

Lu, B., Usui, T., Uemura, T., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1999). Flamingo controls the planar polarity of sensory

bristles and asymmetric division of sensory organ precursor in Drosophila. *Curr. Biol.* 9, 1247-1250.

Lundgren, S. E., Callahan, C. A., Thor, S., and Thomas, J. B. (1995). Control of neuronal pathway selection by the Drosophila LIM homeodomain gene *apterous*. *Development* 121, 1769-1773.

Luo, L., Hensch, T. K., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996). Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* 379, 837-840.

Luo, L., Liao, Y., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: Drosophila Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.* 8, 1787-1802.

Mahoney, P. A., Weber, U., Onofrechuk, P., Biessmann, H., Bryant, P. J., and Goodman, C. S. (1991). The fat tumor suppressor gene in Drosophila encodes a novel member of the cadherin gene superfamily. *Cell* 67, 853-868.

Martin, K. A., Poeck, B., Roth, H., Ebens, A. J., Ballard, L. C., and Zipursky, S. L. (1995). Mutations disrupting neuronal connectivity in the Drosophila visual system. *Neuron* 14, 229-240.

Meinertzhagen, I. A., and O'Neil, S. D. (1991). Synaptic organization of columnar elements in the lamina of the wild type in Drosophila melanogaster. *J. Comp. Neurol.* 305, 232-263.

Meyerowitz, E. M., and Kankel, D. R. (1978). A genetic analysis of visual system development in Drosophila melanogaster. *Dev. Biol.* 62, 112-142.

Mitchell, K. J., Doyle, J. L., Serafini, T., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., and Dickson, B. J. (1996). Genetic analysis of *netrin* genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axon and peripheral motor axons. *Neuron* 17, 203-15.

Montell, D. J., and Goodman, C. S. (1989). Drosophila laminin: sequence of B2 subunit and expression of all three subunits during embryogenesis. *J Cell Biol* 109, 2441-53.

Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1988). Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 7, 3679-3684.

Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., Ohira, M., Kawarabayashi, Y., Ohara, O., Tanaka, A., Kotani, H., Miyajima, N., and Nomura, N. (1996). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. *DNA Res.* 3, 321-329, 341-354.

Nakayama, M., Nakajima, D., Nagase, T., Nomura, N., Seki, N., and Ohara, O. (1998). Identification of high-molecular-weight proteins with multiple EGF-like motifs by motif-trap screening. *Genomics* 51, 27-34.

Nelson, H. B., and Laughon, A. (1994). *Drosophila* glial development is regulated by genes involved in the control of neuronal cell fate. *Roux's Arch Dev Biol* 204, 118-25.

Nose, A., Mahajan, V. B., and Goodman, C. S. (1992). Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell* 70, 553-67.



O'Connor, T. P., and Bentley, D. (1993). Accumulation of actin in subsets of pioneer growth cone filopodia in response to neural and epithelial guidance cue in situ. *J Cell Biol* *123*, 935-48.

Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y., and Takeichi, M. (1994). A *Drosophila* homolog of cadherin associated with Armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev. Biol.* *165*, 716-726.

Park, W. J., Liu, J., and Adler, P. N. (1994b). *frizzled* gene expression and development of tissue polarity in the *Drosophila* wing. *Dev. Genet.* *15*, 383-389.

Park, W. J., Liu, J., and Adler, P. N. (1994a). The *frizzled* gene of *Drosophila* encodes a membrane protein with an odd number of transmembrane domains. *Mech.Dev.* *45*, 127-137.

Patel, N. H. (1994). Imaging neuronal subsets and other cell types in whole-mount *Drosophila* embryos and larvae using antibody probes. *Methods Cell Biol* *44*, 445-87.

Patel, N. H., Snow, P. M., and Goodman, C. S. (1987). Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* *48*, 975-988.

Perrimon, N., and Mahowald, A. P. (1987). Multiple functions of segment polarity genes in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *119*, 587-600.

Prokop, A., Uhler, J., Roote, J., and Bate, M. (1998). The *kakapo* mutation affects terminal arborization and central dendritic sprouting of *Drosophila* motoneurons. *J. Cell Biol.* *143*, 1283-1294.

Riehl, R., Johnson, K., Bradley, R., Grunwald, G. B., Comel, E., Lifenbaum, A., and Holt, C. E. (1996). Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron* *17*, 837-848.

Rodriguez, I., and Basler, K. (1997). Control of compartmental affinity boundaries by hedgehog. *Nature* *389*, 614-618.

Ruan, W., Pang, P., and Rao, Y. (1999). The SH2/SH3 adaptor protein Dock interacts with the Ste20-like kinase Misshapen in controlling growth cone motility. *Neuron* *24*, 595-605.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Ed. CSH Press.

Sano, K., Tanihara, H., Heimark, R. L., Obata, S., Davidson, M., St.John, T., Taketani, S., and Suzuki, S. (1993). Protocadherins: a large family of cadherin -related molecules in central nervous system. *EMBO J* *12*, 2249-56.

Sasaki, M., Kleinman, H. K., Huber, H., Deutzmann, R., and Yamada, Y. (1988). Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J. Biol. Chem.* *263*, 16536-16544.

Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., and Goodman, C. S. (1993). Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* *10*, 409-426.

Senzaki, K., Ogawa, M., and Yagi, T. (1999). Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell* *99*, 635-647.

Shapiro, I., fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grubel, G., Legrand, J. F., Als-Nielsen, J., Colman, D. R., and Hendrickson, W. A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* *374*, 327.

Shulman, J. M., and Johnston, D. S. (1999). Pattern formation in single cells. *Trends Cell Biol.* *9*, 60-64.

Shulman, J. M., Perrimon, N., and Axelrod, J. D. (1998). Frizzled signaling and the developmental control of cell polarity. *Trends Genet.* *14*, 452-458.

Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M. (1998). Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* *281*, 1465-1466.

Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M., and Cantley, L. C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* *275*, 73-77.

Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *7*, 619-627.

Tanaka, E., and Sabry, J. (1995). Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* *83*, 171-176.

Taylor, J., Abramova, N., Charlton, J., and Adler, P. N. (1998). *Van Gogh*: a new *Drosophila* tissue polarity gene. *Genetics* *150*, 199-210.

Tepass, U., and Hartenstein, V. (1994). The development of cellular junction in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* *161*, 563-94.

Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C. S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* *274*, 1123-1133.

Turner, C. M., and Adler, P. N. (1998). Distinct roles for the actin and microtubule cytoskeltons in the morphogenesis of epidermal hairs durin wing development in *Drosophila*. *Nech. Dev.* *70*, 181-192.

Uchida, N., Honjo, Y., Jonson, K. R., Wheelock, M., and Takeichi, M. (1996). The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J. Cell Biol.* *135*, 767-779.

Uemura, T. (1998). The cadherin superfamily at the synapse: more members, more missions. *Cell* *93*, 1095-1098.

Uemura, T., Oda, H., Kraut, R., Hayashi, S., Kataoka, Y., and Takeichi, M. (1996). Zygotic *Drosophila* E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* *10*, 659-671.

Van Vactor, D., Sink, H., Fambrough, D., Tsoo, R., and Goodman, C. S. (1993). Genes that control neuromuscular specificity in Drosophila. *Cell* 73, 1137-1153.

Vinson, C. R., and Adler, P. N. (1987). Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the *frizzled* gene of Drosophila. *Nature* 329, 549-551.

Vinson, C. R., Conover, S., and Adler, P. N. (1989). A Drosophila tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* 338, 263-264.

Wolff, T., and Rubin, G. M. (1998). *strabismus*, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decision in Drosophila. *Development* 125, 1149-1159.

Wong, L. L., and Adler, P. N. (1993). Tissue polarity genes of Drosophila regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *J. Cell Biol.* 123, 209-221.

Xu, T., and Rubin, G. M. (1993). Analysis of mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* 117, 1223-1237.

Younossi-Hartenstein, A., and Hartenstein, V. (1993). The role of the tracheae and musculature during pathfinding of *Drosophila* embryonic sensory axons. *Dev. Biol.* 158, 430-47.

Zemicka-Goetz, M., Pines, J., Ryan, K., Siemering, K. R., Haseloff, J., Evans, M. J., and Gurdon, J. B. (1996). An indelible lineage marker for Xenopus using a mutated green fluorescent protein. *Development* 122, 3719-3724.

和文

平野伸二（1992）博士論文

謝辞

研究生活の全般にわたって指導してくださった上村匡先生に深く感謝します。先生との議論から得たサイエンティフィックな刺激は、研究の大きな糧となりました。千坂修先生、高田慎治先生、宮谷精二先生には、随所で適切なアドバイスを頂きました。竹市研や分子発生生物学研究センターの先輩の皆さんには、大変お世話になりました。特に小田広樹さんと岩井陽一さんには、実験操作の基本を丁寧に教えていただきました。中川真一さんには、実験が行き詰まったときに相談に乗っていただきました。同級生の白神博君、鈴木祥宏君、田中太郎君には公私にわたりお世話になりました。後輩の皆さんには、いつも新鮮な発想を与えていただきました。秘書の皆さん、技官の皆さんにはお世話になりました。この論文の Fig.3-8 は山口木綿子さんが、Fig.4-2 の一部は島田裕子さんが出されたデータを使わせて頂きました。

他研究室の皆さんにもお世話になりました。基礎生物学研究所の能瀬研の皆さん、京大生命科学研究科の竹安研の皆さん、ERATO細胞軸プロジェクトの皆さんには、トランスジェニックフライの作製の際に大変お世話になりました。快く変異系統を分与してくださった Thomas L. Schwarz さんと Robert W. Burgess さんに感謝します。レーザー共焦点顕微鏡を使わせていただいた柳田研と月田研の皆さんに感謝します。また様々な実験材料を快く分与してくださった皆さんに感謝します。

つねに研究者としてのあるべき姿を示して下さった竹市雅俊先生に感謝いたします。研究以外の面でお世話になった友人達に感謝します。そして最後に、いつも温かく見守ってくれた両親に感謝します。